

Entwicklung Transkriptom-basierter
Schwarzrostresistenzmarker sowie histologische und
Transkriptom-basierte Charakterisierung von
Kronenrostresistenzen in *Lolium perenne*

Dissertation

zur Erlangung des Grades
doctor agriculturæ (Dr. agr.)

an der Professur für Phytomedizin
der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

Rostock, 2017

vorgelegt von:

Jens Bojahr

aus Waren

geboren am 01.01.1985 in Teterow

Gutachter:

1. Gutachter

PD Dr. Christine Struck
Professur Phytomedizin, Universität Rostock

2. Gutachter

Professor Dr. Frank Ordon
Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Julius Kühn-
Institut (JKI) - Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen

3. Gutachter

Professor Dr. Ralf T. Vögele
Institut für Phytomedizin, Universität Hohenheim

Datum der Einreichung: 31. Januar 2017

Datum der Verteidigung: 28. Juli 2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	ix
1 Einleitung	1
1.1 Bedeutung von <i>Lolium perenne</i> als Rasen- und Futtergras	1
1.2 Bedeutung und Schadbild von <i>Puccinia graminis</i> f.sp. <i>graminicola</i>	1
1.3 Bedeutung und Schadbild von <i>Puccinia coronata</i> f.sp. <i>lolii</i>	2
1.4 Der Lebenszyklus von <i>Puccinia graminis</i> und <i>Puccinia coronata</i>	3
1.5 Mechanismen der pflanzlichen Abwehr	6
1.6 Markerentwicklung und Lokalisation von Schwarzrostresistenz- assoziierten Transkripten	7
1.7 Problemstellung, Hypothesen und Ziele	9
2 Material und Methoden	14
2.1 Pflanzenmaterial und Rostisolate	14
2.2 Rostvermehrung	14
2.3 Phänotypisierung	15
2.4 Erzeugung von Kronenrosteinsporisolen	16
2.5 Mikroskopische Untersuchungen zur Kronenrostresistenz	17
2.6 Massive analysis of cDNA ends (MACE)	18
2.6.1 Schwarzrost-MACE	18
2.6.2 Kronenrost-MACE	19
2.6.3 RNA-Isolierung, Reverse Transkription und Sequenzierung	21
2.6.4 Bioinformatik	21
2.7 Validierung von ausgewählten Sequenzen der Schwarzrost-MACE mittels quantitativer qRT-PCR	22
2.7.1 RNA Isolierung und Umschreiben der RNA in cDNA	22

2.7.2	Primer und qRT-PCR-Protokoll	22
2.8	Statistische Methoden	23
3	Ergebnisse	25
3.1	Schwarzrostresistenz	25
3.1.1	Phänotypisierung der Kartierungspopulation LPSR1001 auf Schwarzrostresistenz	25
3.1.2	Schwarzrost-MACE	26
3.1.2.1	„Gene Ontology“-Analyse signifikant überexprimierter Transkripte im schwarzrostresistenten Bulk (ResAll)	27
3.1.2.2	Differentiell exprimierte Transkripte und SNPs zwischen ResAll und SusAll.....	27
3.1.2.3	„in silico“-Kartierung von ETRs und SNPs in <i>Brachypodium</i> <i>distachyon</i> und <i>Lolium perenne</i>	28
3.1.2.4	Genetische Kartierung von MACE basierten ETRs und SNPs der schwarzrostresistenten Bulks	30
3.1.2.5	Inokulationsbedingte Überexpression abwehrinduzierter Transkripte in den schwarzrostresistenten und -anfälligen Bulks zusammengefasst in „Gene Ontology“	33
3.1.2.6	Validierung von Expressionsraten ausgewählter <i>Lolium perenne</i> - Transkripte der Schwarzrost-MACE mittels qRT-PCR.....	38
3.2	Kronenrostresistenz.....	40
3.2.1	Phänotypisierung auf Kronenrostresistenz	40
3.2.2	Histologische Charakterisierung der kronenrostresistenten <i>Lolium</i> <i>perenne</i> -Genotypen	41
3.2.2.1	Einfluss der kronenrostresistenten <i>Lolium perenne</i> -Genotypen auf die Keimfähigkeit und Appressorienbildung des Kronenrosteinsporisolats KR-SR1	41
3.2.2.2	Einfluss der kronenrostresistenten <i>Lolium perenne</i> -Genotypen auf die Bildung substomatärer Vesikel und Infektionshyphen des Kronenrosteinsporisolats KR-SR1	43

3.2.2.3	Einfluss der kronenrostresistenten <i>Lolium perenne</i> -Genotypen auf die Haustorienmutterzellen Entwicklung des Kronenrost-einsporisols KR-SR1	44
3.2.3	Kronenrost-MACE	46
3.2.3.1	„Gene Ontology“ mit überexprimierten Transkripten in den kronenrostresistenten <i>Lolium perenne</i> -Genotypen	47
3.2.3.2	Differenziell exprimierte Gene zwischen den kronenrostresistenten <i>Lolium perenne</i> -Genotypen nach Inokulation mit dem Kronenrosteinsporisolat mit Zuordnung zur pflanzlichen Abwehr	52
3.2.3.3	Einfluss der Kronenrostinokulation auf die Genexpression der <i>Lolium perenne</i> -Genotypen	55
3.2.3.4	„Gene Ontology“ mit überexprimierten Transkripten in den <i>Lolium perenne</i> -Genotypen induziert durch die Kronenrostinokulation	56
3.2.3.5	Überexprimierte Transkripte in den <i>Lolium perenne</i> -Genotypen induziert durch die Kronenrostinokulation.....	59
3.3	Vergleich der Schwarz- und Kronenrostresistenz in der Kartierungspopulation LPSR1001.....	62
3.3.1	Vergleich der Boniturmodalwerte der Phänotypisierungen zur Schwarz- und Kronenrostresistenz	62
3.3.2	Vergleich der Genexpression des schwarzrostresistenten <i>Lolium perenne</i> -Bulks mit den kronenrostresistenten <i>Lolium perenne</i> -Genotypen.....	63
3.3.3	Vergleich der Genexpression von schwarz- und kronenrost-inokulierten Bulks und Genotypen	65
4	Diskussion	67
4.1	Schwarzrostresistenz- <i>LpPg1</i>	67
4.1.1	Markerentwicklung, „ <i>in silico</i> “-Kartierung und <i>LpPg1</i> -vermittelte Genexpression	70

4.1.2	Differentielle und <i>LpPg1</i> -vermittelte Genexpression in den schwarzrostresistenten <i>Lolium perenne</i> -Bulks.....	71
4.2	Kronenrostresistenz.....	74
4.2.1	Histologische Unterschiede und differentielle Genexpression zwischen dem kronenrostanfälligen und den -resistenten <i>Lolium perenne</i> -Genotypen	77
4.2.1.1	Vollständige Kronenrostresistenz	79
4.2.1.2	Moderate Kronenrostresistenz.....	83
4.3	Vergleich der Schwarz- und Kronenrostresistenz	86
5	Schlussfolgerungen	89
6	Zusammenfassung	91
7	Literatur	95
Anhang		
A1	SNP- und ETR-Primersequenzen der genetischen Kartierung von <i>LpPg1</i>	
A2	Auszählungen zur Entwicklung der Kronenrostinfektionsstrukturen in kronenrostresistenten und -anfälligen <i>Lolium perenne</i> -Genotypen	
A3	„Gene Ontology“ signifikant überexprimierter Transkripte in den kronenrostresistenten und -anfälligen <i>Lolium perenne</i> -Genotypen	
A4	„Gene Ontology“ signifikant überexprimierter Transkripte in den kronenrostinokulierten <i>Lolium perenne</i> -Genotypen im Vergleich zum nicht inokulierten Zeitpunkt	
A5	Signifikant überexprimierte Transkripte in den kronenrostinokulierten <i>Lolium perenne</i> -Genotypen 6, 12 und 24 Stunden nach Inokulation	

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Schwarzrost-Uredosporenlager auf einem infizierten <i>Lolium perenne</i> -Blatt	2
Abb. 1.2 Kronenrost-Uredosporenlager auf <i>Lolium perenne</i> -Blattsegmenten 10 Tage nach Inokulation	3
Abb. 1.3 Lebenszyklus von <i>Puccinia graminis</i> nach Leonard und Szabo (2005)	4
Abb. 1.4 Roststrukturen von <i>Puccinia graminis</i> ausgebildet während der frühen Infektionsphase der Uredosporenbildung nach Leonard und Szabo (2005)	5
Abb. 2.1 Inokulierte Blattsegmente der hochanfälligen <i>Lolium perenne</i> -Sorte Aurora mit Schwarzrost-Sporensuspension (links) und ersten Uredosporenlagern nach 10 Tagen (rechts)	15
Abb. 2.2 Schwarzrost inokulierte resistente (links) und anfällige <i>Lolium perenne</i> -Phänotypen (rechts) der Kartierungspopulation LPSR1001 10 Tage nach Inokulation	19
Abb. 3.1 Häufigkeitsverteilung der Boniturmodalwerte von 114 <i>Lolium perenne</i> -Genotypen der Kartierungspopulation LPSR1001 inokuliert mit vier Schwarzrostfeldisolaten in vierfacher Wiederholung	26
Abb. 3.2 Anzahl exklusiver Transkripte der schwarzrostresistenten <i>Lolium perenne</i> -Bulks und SNPs mit Sequenzhomologie zu <i>Brachypodium distachyon</i> -Chromosomen	29
Abb. 3.3 Anzahl von SNPs und exklusiv exprimierten Transkripten der resistenten Bulks von <i>Lolium perenne</i> zwischen 26,0 - 34,5 Mbp auf <i>Brachypodium distachyon</i> -Chromosom 1 (Bd1)	29
Abb. 3.4 Gelbild mit PCR-Produkten des co-segregierenden Marker <i>LpETR_18</i> von vier resistenten Genotypen mit <i>LpPg1</i> -Resistenz, vier anfälligen Genotypen ohne <i>LpPg1</i> -Resistenz, dem resistenten Elter und dem anfälligen Elter	30
Abb. 3.5 Genetische Karte vom Resistenzlocus <i>LpPg1</i> mit ETR- und SNP-Markern aus der Schwarzrost-MACE	32
Abb. 3.6 Anzahl signifikant überexprimierter und runterregulierter <i>Lolium perenne</i> -Transkripte in den inokulierten schwarzrostresistenten und -anfälligen Bulks im Vergleich zum nicht inokulierten Zeitpunkt	34

Abb. 3.7 qPCR-Ergebnisse zur Validierung der Schwarzrost-MACE-Expressionsraten an acht überexprimierten <i>Lolium perenne</i> -Transkripten in den schwarzrostresistenten im Vergleich zu den -anfälligen Bulks	39
Abb. 3.8 Häufigkeitsverteilung der Boniturmodalwerte von 284 <i>Lolium perenne</i> -Genotypen der Kartierungspopulation LPSR1001 inokuliert mit drei Kronenrostfeldisolaten in vierfacher Wiederholung	40
Abb. 3.9 <i>Lolium perenne</i> -Genotypen inokuliert mit dem Kronenrosteinsporisolat KR-SR1 7 Tage nach Inokulation	41
Abb. 3.10 Keimschläuche und Appressorien von <i>Puccinia coronata</i> auf der adaxialen Blattoberfläche des kronenrostanfälligen Genotyps angefärbt mit Fluorescent Brightener 28	42
Abb. 3.11 Prozentualer Anteil gebildeter <i>Puccinia coronata</i> -Appressorien auf ausgewählten <i>Lolium perenne</i> -Genotypen 6 und 12 Stunden nach Inokulation	43
Abb. 3.12 Prozentualer Anteil gebildeter substomatärer Vesikel von <i>Puccinia coronata</i> auf ausgewählten <i>Lolium perenne</i> -Genotypen 12 und 24 – 60 Stunden nach Inokulation	44
Abb. 3.13 Zeitlicher Verlauf der Haustorienmutterzellen-Bildung von <i>Puccinia coronata</i> in ausgewählten <i>Lolium perenne</i> -Genotypen 12 bis 60 Stunden nach Inokulation	45
Abb. 3.14 Infektionsstrukturen und Autofluoreszenz der Mesophyllzellen nach Kontakt mit Haustorienmutterzellen im vollständig resistenten <i>Lolium perenne</i> Genotyp 60 Stunden nach Inokulation angefärbt mit Fluorescent Brightener 28	46
Abb. 3.15 Anzahl signifikant differentiell exprimierter Transkripte ausgewählter kronenrostresistenter <i>Lolium perenne</i> -Genotypen im Vergleich zum anfälligen Genotyp	47
Abb. 3.16 Anzahl differentiell exprimierter Transkripte in den mit <i>Puccinia coronata</i> inokulierten <i>Lolium perenne</i> -Genotypen im Vergleich zum jeweiligen nicht inokulierten Zeitpunkt	56
Abb. 3.17 Anzahl der abwehrspezifischen, überexprimierten Transkripte nach <i>Puccinia coronata</i> -Inokulation in allen <i>Lolium perenne</i> -Genotypen zusammengefasst nach ihrer Funktion	59

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1 Verwendetes Pflanzen- und Uredosporenmaterial	16
Tab. 2.2 Vergleichende Darstellung der Schwarz- und Kronenrost-MACE Experimente	20
Tab. 2.3 Primersequenzen ausgewählter MACE-Transkripte zur Validierung der Schwarzrost-MACE-Ergebnisse mittels qRT-PCR	23
Tab. 3.1 „Gene Ontology“ signifikant überexprimierter Transkripte in allen resistenten <i>Lolium perenne</i> -Bulks (ResAll) zusammengefasst nach ihrer biologischen Funktion in GOs	27
Tab. 3.2 Signifikant überexprimierte Transkripte mit Annotation zur Pflanzenabwehr in allen schwarzrostresistenten <i>Lolium perenne</i> -Bulks (ResAll)	28
Tab. 3.3 Exklusive Transkripte der resistenten <i>Lolium perenne</i> -Bulks mit Sequenzhomologie zu Resistenzgenen und Zuordnung zum Referenzgenom von <i>Brachypodium distachyon</i>	30
Tab. 3.4 Abwehrspezifische Transkripte induziert durch die Inokulation mit Schwarzrosturedosporen in den resistenten und anfälligen <i>Lolium perenne</i> -Bulks	35
Tab. 3.5 „Gene Ontology“ signifikant überexprimierter Transkripte in den <i>Puccinia coronata</i> -resistenten <i>Lolium perenne</i> -Genotypen im Vergleich zum anfälligen Genotyp 0 – 24 Stunden nach Inokulation	49
Tab. 3.6 Signifikant überexprimierte Transkripte in den <i>Puccinia coronata</i> -resistenten <i>Lolium perenne</i> -Genotypen im Vergleich zum anfälligen Genotyp 0 – 24 Stunden nach Inokulation	52
Tab. 3.7 „Gene Ontology“ <i>Puccinia coronata</i> induzierter, signifikant überexprimierter Transkripte, mit Zuordnung zur pflanzlichen Abwehr, in den <i>Lolium perenne</i> -Genotypen 6, 12 und 24 Stunden nach Inokulation mit dem Kronenrosteinsporisolat KR-SR1	57
Tab. 3.8 Exklusiv und hoch differentiell exprimierte Transkripte im vollständig kronenrostresistenten <i>Lolium perenne</i> -Genotyp und dem resistenten Elter im Vergleich zum anfälligen Genotyp 6, 12 und 24 Stunden nach Inokulation mit dem Kronenrosteinsporisolat KR-SR1	60

Tab. 3.9 Exklusiv und hoch differentiell exprimierte Transkripte im vollständig und moderat kronenrostresistenten <i>Lolium perenne</i> -Genotyp im Vergleich zum anfälligen Genotyp 6, 12 und 24 Stunden nach Inokulation mit dem Kronenrosteinsporisolat KR-SR1	61
Tab. 3.10 Korrelationsanalyse der Boniturmodalwerte zwischen den Schwarz- und Kronenrost-Phänotypisierungen	62
Tab. 3.11 „Gene Ontology“ signifikant überexprimierter Transkripte beteiligt an pflanzlichen Abwehrreaktionen in inokulierten und nicht inokulierten schwarz- und kronenrostresistenten <i>Lolium perenne</i> -Bulks/Genotypen	64
Tab. 3.12 Identische, signifikant überexprimierte Transkripte nach Schwarz- bzw. Kronenrostinokulation in schwarz- bzw. kronenrostresistenten <i>Lolium perenne</i> -Bulks/Genotypen im Vergleich zum jeweiligen anfälligen Bulk/Genotyp (\log_2 fold change ≥ 2)	65
Tab. 3.13 Identische, signifikant überexprimierte Transkripte in schwarz-bzw. kronenrostinokulierten resistenten <i>Lolium perenne</i> -Bulks/Genotypen im Vergleich zum nicht inokulierten resistenten Bulk/Genotyp (\log_2 fold change ≥ 2)	66
Tab. 4.1 Ausgewählte Schwarzrostresistenz-assoziierte Transkripte der <i>LpPg1</i> -vermittelten Genexpression	68
Tab. 4.2 Ausgewählte Kronenrostresistenz-assoziierte Transkripte der kronenrostresistenten <i>Lolium perenne</i> -Genotypen	74

Abkürzungsverzeichnis

AG	anfälliger Genotyp
APP	Appressorium
Bd	<i>Brachypodium distachyon</i> -Chromosom
BSA	„Bulked Segregant Analysis“
<i>BSK8</i>	„Brassinosteroid-signaling kinase 8“-Gen
cM	centi Morgan
<i>CRK7</i>	„Cysteine-rich receptor-like protein kinase 7“-Gen
<i>crk7</i>	Genotyp mit ausgeschaltetem „Cystein-rich receptor-like protein kinase 7“-Gen
DAB	Diaminobenzidin
<i>EF-Tu</i>	Elongationsfaktor-Tu-Gen
<i>ELF-1α</i>	Elongationsfaktor-1alpha-Gen
ETR	Exklusive Transkripte der resistenten Bulks
GO	„Gene Ontology“
HMZ	Haustorienmutterzelle
hpi	Stunden nach der Inokulation
IH	Infektionshyphe
KR-SR1	Kronenrosteinsporisolat 1 aus Steinach (2012)
LG	„Linkage group“ / Kopplungsgruppe
log2FC	x-fache Expression zum Vergleichspartner logarithmiert zur Basis 2 (log2 Fold Change)
<i>LpPg1</i>	Bezeichnung des Schwarzrostresistenzlokus der Kartierungspopulation LPSR1001
LRR	„Leucin rich repeat“/Leucin-reiche Wiederholung
MACE	“Massive Analysis of cDNA Ends”
<i>MAPR/MAPR2</i>	„Membrane steroid-binding protein“/Membrane steroid-binding proteine 2 Gen
Mbp	Megabasenpaare
miRNA	„micro RNA“
MRG	moderat resistenter Genotyp
NGS	„next generation sequencing“
OG	Oligogalakturonsäure
PAMPGO	„Plant Associated Microbe Gene Ontology Consortium“/Pflanzen-assoziiertes Mikrogen Gen Ontologie Konsortium
PR	„Pathogenesis related protein“-Gen
qRT-PCR	„quantitative Realtime-Polymerase chain reaction“/quantitative Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion
QTL	„Quantitative Trait Loci“/Region eines quantitativen Merkmals
RE	resistenter Elter

ResAll	Zusammenfassung aller Zeitpunkte der schwarzrostresistenten Bulks
RGa	„Resistance Gene Analog“-Gen
RLK5	„Receptor-like protein kinase 5“-Gen
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPM1	„Disease Resistance Protein RPM1“-Gen (Resistenz gegen <i>Pseudomonas syringae</i>)
RPP8	„Disease Resistance Protein RPP8“-Gen (Resistenz gegen <i>Peronospora parasitica</i>)
RPP13	„Disease Resistance Protein RPP13“-Gen (Resistenz gegen <i>Peronospora parasitica</i>)
siRNA	„Small interfering RNA“/kleine eingreifende RNA
SNP	„Single Nucleotide Polymorphism“/Variation eines einzelnen Basenpaares
SRG1	„Protein SRG1“-Gen
SSR	„Simple Sequence Repeat“/einfache Sequenzwiederholung
SSV	Substomatäres Vesikel
SusAll	Zusammenfassung aller Zeitpunkte der schwarzrostanfälligen Bulks
TGA4	„Transcriptionsfactor TGA4“-Gen
VRG	vollständig resistenter Genotyp
VSR	„Vacuolar Sorting Receptor“-Gen
WAK1	„Wall associate Receptor 1“-Gen
WRKY	„Transcriptionsfactor WRKY“-Gen
XIP I	„Xylanase inhibitor protein 1“-Gen
XRN4	„5'-3' exoribonuclease 4“-Gen

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von *Lolium perenne* als Rasen- und Futtergras

Das ausdauernde Weidelgras (*Lolium perenne* L.) ist eines der bedeutendsten Futtergräser in den gemäßigten Breiten weltweit (Wilkins 1991) und bestimmt mit ca. 60% den höchsten Anteil der Grassamennutzung in Europa (Abberton et al. 2008). In der Viehwirtschaft wird es wegen seiner schnellen Etablierung, hohen Erträgen und Nährstoffgehalten, der guten Verdaulichkeit und dem damit verbundenem hohen Futterwert geschätzt (Kimbeng 1999; Lenuweit und Gharadjedaghi 2002; Schubiger et al. 2010). Auf Grund der mehrjährigen Nutzung von *L. perenne* sind die Produktionskosten und der Pflanzenschutz im Vergleich zu einjährigen Gräsern geringer und durch eine dichte Grasnarbe die Bodenerosion reduziert (Wilkins 1991). Als Rasengras wird *L. perenne* in Mischung mit weiteren Gräsern als Oberfläche für Sportplätze und zur Begrünung von Parks und privaten Rasenflächen genutzt (Jo et al. 2008). Auf Sportplätzen und Parkanlagen kann *L. perenne* dazu beitragen, Verletzungen zu reduzieren, als Erosionsschutz dienen, die Luft- und Lärmbelastung reduzieren und hohe Lufttemperaturen senken (Bonos et al. 2006). Durch die weltweite Verbreitung als Rasen- und Futtergras wird *L. perenne* von zahlreichen Krankheiten befallen. In der Produktion von Gras als Wiederkäuerfutter und in der Grassamenproduktion stellen phytopathogene Pilze eine signifikante Bedrohung dar. Die Züchtung von resistenten Sorten stellt bei der Bekämpfung dieser Pathogene die wirtschaftlich und ökologisch effizienteste Lösung dar (Dracatos et al. 2009b).

1.2 Bedeutung und Schadbild von *Puccinia graminis* f.sp. *graminicola*

Der Schwarzrost (*Puccinia graminis* f.sp. *graminicola*) führt in der Gräservermehrung zu hohen Ertragsverlusten (Welty und Barker 1992; Pfender 2009; Schubiger et al. 2010) und kann in unbehandelten anfälligen Beständen einen Ertragsverlust von bis zu 98 % verursachen (Pfender 2009). Symptome treten bei Schwarzrostbefall an der gesamten oberirdischen Pflanze auf, jedoch hauptsächlich am Stängel und den Blattscheiden (Leonard und Szabo 2005). Dort bilden sich kaffeebraune Uredosporenlager (Abb. 1.1) von 2 – 3 cm Länge,

die häufig zusammenwachsen, streifenförmige Pusteln bilden und sich über den gesamten Halm ausbreiten. Dadurch wird die photosynthetisch aktive Fläche und Photosyntheseleistung der oberen Blattoberseite und des Halmes reduziert (Hampton 1986). Des Weiteren wird der Transport von Assimilaten im Phloem in die infizierten Gewebe umgeleitet und führt dadurch zu einer Reduktion des Samenertrags und der Tausendkornmasse (Pfender 2009).



Abb. 1.1 Schwarzrost-Uredosporenlager auf einem infizierten *Lolium perenne*-Blatt

1.3 Bedeutung und Schadbild von *Puccinia coronata* f.sp. *lolii*

Der Kronenrost (*Puccinia coronata* f.sp. *lolii*) ist eine weltweit verbreitete Pilzkrankheit in *L. perenne*, die erhebliche Trockenmasse- und Qualitätsverluste auf Wiesen und Weiden der Wiederkäuerfütterung und Schäden in der Rasennutzung verursacht (Mattner und Parbery 2007; Dracatos et al. 2010; Schubiger et al. 2013). Symptome eines Kronenrostbefalls sind runde, pulverförmige, orangefarbene Uredosporenlager auf den Blattoberseiten (Abb. 1.2). Infektionen führen zu Trockenmasseverlusten von bis zu 56 % und einem erhöhten Absterben von Bestockungstrieben in unbehandelten Beständen (Potter 1987; Plummer et al. 1990; Mattner und Parbery 2007). Dies führt zu einem lückigen Bestand und einem erhöhten Vorkommen von unerwünschten Arten im Grünland und Rasen. Bedingt durch das Aufbrechen der Blattepidermis während der Sporulation kommt es zu einem erhöhten Wasserverlust durch Transpiration, einem Abbau an wasserlöslichen Kohlenhydraten und einer reduzierten Verdaulichkeit (Potter 1987; Reheul und Ghesquiere 1996; Schubiger et al. 2006). In der Milchproduktion führt die verringerte Verdaulichkeit zu reduzierten Milchleistungen und einer Ablehnung von hoch infiziertem Gras bei Milchkühen (Kimbeng 1999; Smit et al. 2005).

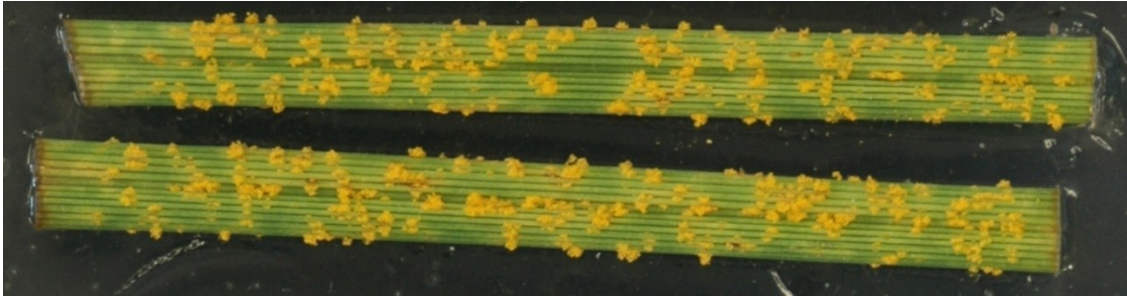


Abb. 1.2 Kronenrost-Uredosporenlager auf *Lolium perenne* Blattsegmenten 10 Tage nach Inokulation

1.4 Der Lebenszyklus von *Puccinia graminis* und *Puccinia coronata*

P. graminis und *P. coronata* entwickeln einen komplexen vollständigen Lebenszyklus, wobei beide Rostpilze einen Wirtswechsel durchlaufen (Abb. 1.3). Am Ende der Wachstumsphase der Gräser werden dickwandige zweizellige Teleutosporen gebildet, die sich vornehmlich auf den Blattscheiden und Halmen befinden, schwarzbraun sind und als Ruhesporen auf dem Stroh der Gräser den Winter überdauern. Mit dem Frühjahr und dem beginnenden Blattwachstum des Dikaryontenwirtes, der Berberitze (*Berberis vulgaris*) beim Schwarzrost und dem Kreuzdorn (*Rhamnus cathartica*) beim Kronenrost, erfolgt die Karyogamie in den keimenden dikaryotischen Teleutosporen. Dabei verschmelzen die beiden Zellkerne der Teleutospore und nach einer anschließenden Meiose entstehen vierzellige Basidien und vier haploide Basidiosporen. Die Basidiosporen werden über kurze Distanzen (180-270 m) durch Wind auf den Dikaryontenwirt übertragen und dringen dort in die Epidermiszellen ein. Nach ca. 5 Tagen bilden sich auf der Blattoberseite Spermagonien, die nach 7-14 Tagen Spermastien enthalten und aus denen Empfängnishyphen hervorstehen. Nach der Befruchtung der Empfängnishyphen mit einem kompatiblen Spermastium entwickelt sich aus den beiden Gameten ein dikaryotisches Myzel, mit dem der dikaryotische Zustand wiederhergestellt ist. Aus diesem Myzel bildet sich auf der Blattunterseite ein Aecidium in denen Aecidiosporen gebildet werden. Durch das Abtrocknen der feuchten Aecidien und durch Wind werden die Aecidiosporen auf den Haplontenwirt, die Gräser übertragen. Wegen der hohen Anzahl an Blättern und einer starken Infektion des Alternativwirtes kann es zu einem hohen Infektionsdruck durch Aecidiosporen im Umkreis von 100 m kommen. Bei einer optimalen Temperatur von 22°C und Feuchtigkeit auf den Blättern keimen die Aecidiosporen und dringen über die Stomata in den Haplontenwirt, das

ausdauernde Weidelgras, ein. Nach erfolgreicher Infektion werden zwischen 7 und 14 Tagen Uredosporen gebildet, die durch Wind über weite Strecken auf umliegende Wirte verbreitet werden (Roelfs 1985). Damit setzt sich das Uredosporen-Stadium fort, bis im Herbst Teleutosporen gebildet werden, die auf dem Stroh der Gräser den Winter überdauern und im Frühjahr den Dikaryontenwirt infizieren.

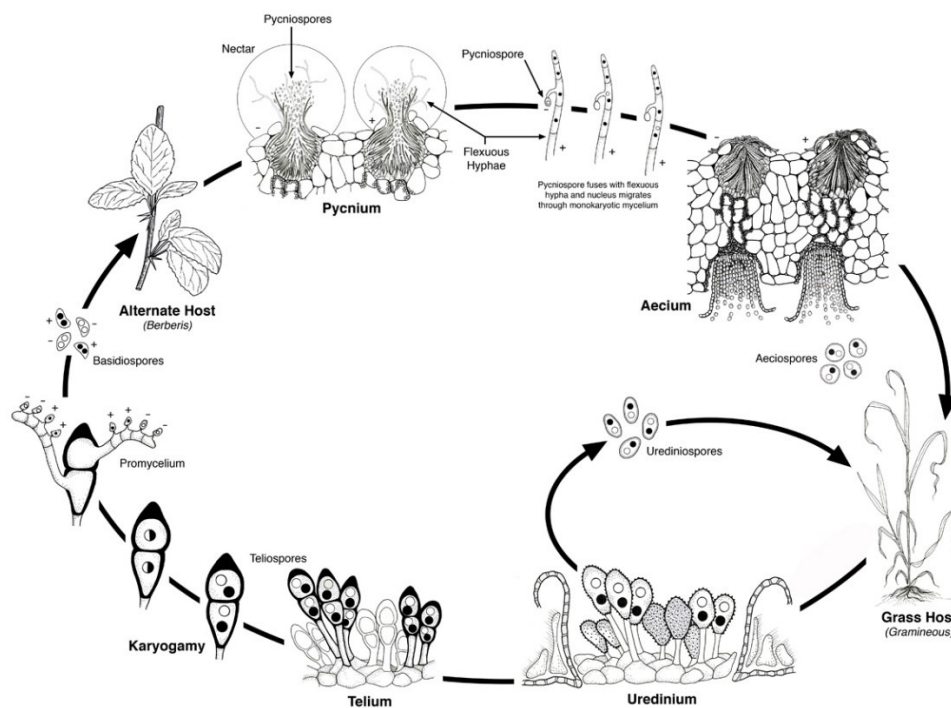
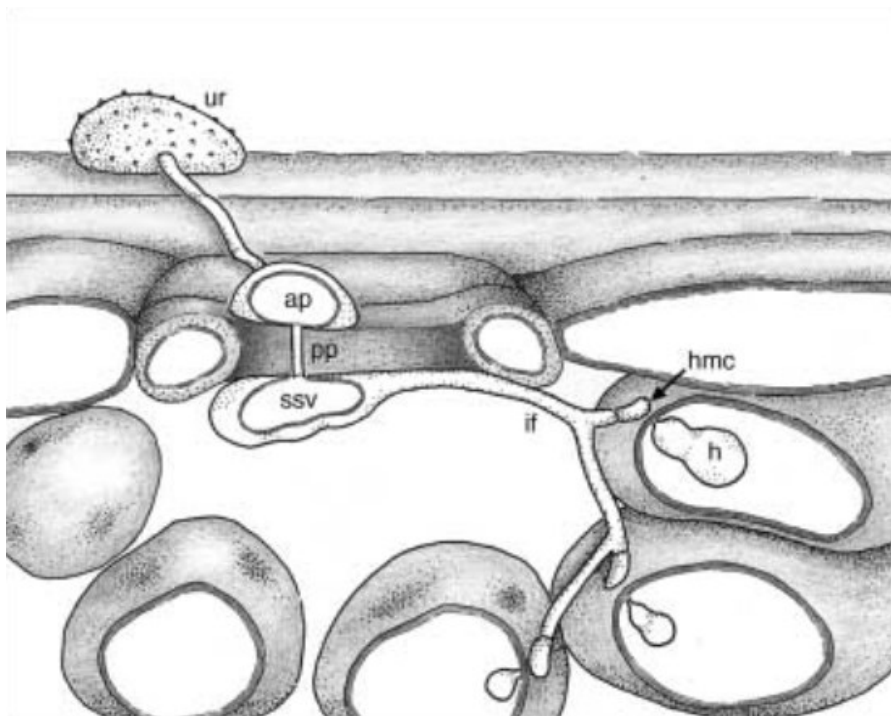


Abb. 1.3 Lebenszyklus von *Puccinia graminis* nach Leonard und Szabo (2005)

Mit der Bildung von Uredosporen beginnt das Sommer- bzw. Uredostadium (Diplophase). Nachdem Uredosporen auf den Blättern oder Stängeln des Wirtes gelandet sind, benötigen sie einen Wasserfilm bzw. ausreichend Feuchtigkeit, um zu keimen. Nach erfolgreicher Keimung bildet die Uredospore einen Keimschlauch, der sich an der Blatt- oder Stängeloberfläche orientiert, sich an die Kutikula anpresst und damit die Möglichkeit, ein Stoma zu finden, erhöht. Sobald der Keimschlauch ein Stoma erreicht hat, endet das Längenwachstum und es wird ein Appressorium über der Öffnung des Stoma gebildet. Ausgehend davon wächst aus dem Appressorium ein Penetrationskeil durch das Stoma in den Interzellularraum. Dort bildet der Rost ein substomatäres Vesikel aus, von dem das Mesophyllgewebe durch Infektionshyphen besiedelt wird. Wenn die Spitze einer Infektionshyphe in Kontakt mit einer Mesophyllzelle kommt,

entwickelt sich am Ende der Infektionshyphae eine sich abgrenzende Haustorienmutterzelle (Leonard und Szabo 2005). Die Haustorienmutterzelle bildet einen schmalen Keil, der durch Druck und enzymatische Auflösung der pflanzlichen Zellwand in den Apoplast der Mesophyllzelle eindringt (Harder und Chong 1984). Nach der Penetration der Wirtszelle wird ein Haustorium im Apoplast ausgebildet, das Nährstoffe extrahiert (Struck 1996; Hahn et al. 1997; Voegelé et al. 2001; Voegelé und Mendgen 2003) und die parasitäre Phase der Rostentwicklung einleitet (Abb. 1.4). In einer anfälligen bzw. kompatiblen Wirt/Parasit-Beziehung wird anschließend der Phloemtransport in das infizierte Gewebe umgeleitet, um den Rostpilz mit Nährstoffen für das Wachstum und die Sporulation zu versorgen (Roelfs 1985). Nach 7 bis 14 Tagen bricht die Epidermis der Weidelgrasblätter auf, die Sporulation setzt ein und die Uredosporen werden durch Wind auf umliegende Wirte verbreitet. Auf diesen erfolgen die Entwicklung der Roststrukturen und die Uredosporenbildung erneut.



ur = Uredospore, ap = Appressorium, pp = Penetrationskeil, ssv = substomatales Vesikel,
if = Infektionshyphae, hmc = Haustorienmutterzelle, h = Haustorium

Abb. 1.4 Roststrukturen von *Puccinia graminis* ausgebildet während der frühen Infektionsphase der Uredosporenbildung nach Leonard und Szabo (2005)

1.5 Mechanismen der pflanzlichen Abwehr

Die Abwehrreaktionen von Pflanzen gegenüber Pathogenen werden in qualitative und quantitative Resistenz eingeordnet. Eine qualitative Resistenz, auch als rassenspezifische Resistenz bezeichnet, basiert auf der Gen-für-Gen-Hypothese nach Flor (1971). Danach basiert die Auslösung der Resistenzreaktion auf der Interaktion zwischen einem Resistenzgen des Wirtes und einem spezifischen dazugehörigen Avirulenzgen des Pathogen. Für diese Interaktion ist eine enge räumliche Nähe als Schnittstelle zwischen Pathogen und Wirtszelle notwendig. In der posthaustoriellen Phase der Rostentwicklung befindet sich das Haustorium im Apoplast der Wirtszelle. In diesem Stadium haben die haustorielle und wirtseigene Plasmamembran direkten Kontakt, was eine intensive Interaktion vermuten lässt (Hahn und Mendgen 2001; Voegelé und Mendgen 2003; Jones und Dangl 2006). Qualitative Rost-Resistenzen in Getreide und Gräsern zeigen meist nach der Ausbildung von Haustorien eine hypersensitive Reaktion mit anschließendem programmierten Zelltod der infizierten Wirtszelle (Kloppers und Pretorius 1997; Bozkurt et al. 2010; Graichen et al. 2011; Sánchez-Martín et al. 2012). Diese Reaktion kann fluoreszenzmikroskopisch durch eine Autofluoreszenz der betroffenen Zelle nachgewiesen werden. In Weizen- und Hafer-Genotypen mit einer qualitativen posthaustoriellen Resistenz stagnierte die Rostentwicklung nach Bildung der ersten Haustorienmutterzellen zwischen 24 und 48 hpi. Anschließend trat eine Autofluoreszenz der infizierten Wirtszellen ab ca. 60 hpi ein, was auf den hypersensitiven Zelltod schließen lässt und damit die parasitäre Phase der Rostentwicklung verhindert (Kloppers und Pretorius 1997; Sánchez-Martín et al. 2012).

Im Gegensatz dazu führt eine quantitative rassenspezifische Resistenz nicht zum vollständigen Erliegen der Rostentwicklung. Eine Form dieser Resistenz ist durch eine Verzögerung der Rostentwicklung charakterisiert und wird als „slow rusting“ bezeichnet (Skovmand et al. 1978). Der Nachweis einer „slow rusting“-Resistenz kann durch verschiedene Vergleiche der Pathogenentwicklung erbracht werden, unter anderem durch den Vergleich von Rostentwicklungskurven zwischen anfälligen und „slow rusting“-Genotypen (Wilcoxson 1981). Die Mechanismen dieser Resistenzen sind weitestgehend unbekannt. Ma und Shang (2009) zeigten für die „slow rusting“-Resistenz im

Weizen gegenüber dem Gelbrost (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*) eine Verstärkung der Zellwand durch die Ablagerung von Callose, einem beta-1,3-Glucan, um die Haustorien herum. Diese physikalische Barriere führt zu einer reduzierten Entwicklungsgeschwindigkeit, einer verlängerten Latenzphase und reduzierten Befallsstärke (Ma und Shang 2009).

In der Resistenzzüchtung liegt der Fokus besonders auf den qualitativen Resistenzen, weil diese auf einem Gen basieren und sich dadurch leichter in bestehendes Zuchtmaterial einkreuzen lassen. Durch resistenzspezifische molekulare Marker kann die Züchtung von resistenten Sorten zusätzlich beschleunigt werden, in dem zeitaufwändige Resistenztests ersetzt und die Anzucht und Pflege auf resistente Kreuzungsnachkommen konzentriert wird. In *L. perenne* wurden bereits qualitative und quantitative Resistenzen gegenüber dem Schwarz- und Kronenrost identifiziert, mit dem Ziel molekulare Marker für die Züchtung bereit zu stellen (Rose-Fricker et al. 1986; Dumsday et al. 2003; Muylle et al. 2005; Sim et al. 2007; Jo et al. 2008; Dracatos et al. 2009a; Beckmann et al. 2010; Pfender et al. 2011; Pfender und Slabaugh 2013).

1.6 Markerentwicklung und Lokalisation von Schwarzrostresistenz-assoziierten Transkripten

Um Resistenzgene zu identifizieren, können Transkriptom basierte Methoden eine effektive Alternative zu bereits bestehenden Markersystemen, wie „Simple Sequence Repeat“ (SSR)- und „Resistance Gene Analog“ (RGA)-Markern sein. Vorteile der Transkriptom-basierten Methode ist, dass ausschließlich exprimierte Sequenzen erfasst und sich wiederholende Regionen ausgespart werden (Deschamps und Campbell 2009). Mit einer Kartierungspopulation, die eine definierte Aufspaltung in resistente und anfällige Genotypen zeigt, können „resistente“ und „anfällige Bulks“ gebildet werden. Genotypen in einem Bulk können genetisch unterschieden, müssen aber in einem Merkmal identisch sein („bulk segregant analysis“ (BSA)). Zusammen mit der „next-generation sequencing“ basierten digitalen Genexpressionsanalyse „Massive Analysis of cDNA Ends“ (MACE) (Kahl et al. 2012; Zawada et al. 2014; Nold-Petry et al. 2015) lassen sich aus diesen Bulks Kandidatengene identifizieren, die bereits erfolgreich zur Markerentwicklung genutzt wurden (Bojahr et al. 2016). Diese Methode hat bereits in verschiedensten Kulturpflanzen zur erfolgreichen

Identifikation von resistenzassoziierten Sequenzen für die Markerentwicklung beigetragen (Jing et al. 2013; Randhawa et al. 2014; Mamo et al. 2015).

Zusätzlich zur Identifikation von resistenzassoziierten Transkripten können die gewonnenen Informationen dazu beitragen, molekulare Mechanismen der Resistenz aufzudecken bzw. diese an Hand ihrer Expressionsprofile zu charakterisieren. Der Einfluss von Rostinfektionen auf die Genexpression von resistenten und anfälligen Genotypen wurde in der Wirt/Parasit-Interaktion zwischen Weizen und *Puccinia* spp. untersucht (Hulbert et al. 2007; Coram et al. 2010; Manickavelu et al. 2010; Zhang et al. 2011b). Diese Untersuchungen zeigten, dass während der Rostinfektion unterschiedlichste Signalwege und abwehrassoziierte Gene exprimiert werden, die für Resistenzgene, Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren und antifungale Proteine codieren (Manickavelu et al. 2010; Zhang et al. 2011a; Guo et al. 2011). Ein weiterer Vorteil der Transkriptom-basierten Methoden ist die Möglichkeit, über eine „*in silico*“-Kartierung auf die Lage des Resistenzlokus, auf bestimmten Kopplungsgruppen zu schließen. Zu diesem Zweck entwickelte Pfeifer et al. (2013) den „perennial ryegrass GenomeZipper“ der auf der Transkriptomkarte von Studer et al. (2012) basiert. Diese Karte umfasst insgesamt 838 DNA-Marker und umspannt 750 (cM) mit einer durchschnittlichen Markerdichte von 0,9 cM. Bevor der „perennial ryegrass GenomeZipper“ veröffentlicht wurde, war ein Vergleich zwischen Kopplungsgruppen limitiert, da diese auf unterschiedlichen Markersystemen und Auflösungen der genetischen Karten basieren. Der „GenomeZipper“ hingegen nutzt die identifizierten Gemeinsamkeiten in der Reihenfolge von Genen oder Gensegmenten auf verschiedenen chromosomalen Abschnitten zwischen *L. perenne* und den Referenzgenomen von *Brachypodium distachyon*, Reis und Sorghum aus und arrangiert diese gemeinsamen chromosomalen Abschnitte entlang eines Markergerüsts (Pfeifer et al. 2013). Über den Abgleich von *Lolium*-Sequenzen mit den Referenzgenomen kann über homologe Sequenzen der Referenzgenome auf die Position der *Lolium*-Sequenz im Markergerüst geschlossen werden. Durch Byrne et al. (2015) wurde der „perennial ryegrass GenomeZipper“ weiterentwickelt und damit eine Syntenie basierte Vorstufe des *L. perenne* Genoms konstruiert, das auf der Genordnung von 11.311 Genen basiert und insgesamt 1128 Mbp des *L. perenne* Genoms umfasst. Der Ansatz des „GenomeZippers“ wurde bereits in Gerste erfolgreich bei der

Markerentwicklung und detaillierten Markerabdeckung von spezifischen Bereichen eingesetzt (Yang et al. 2013).

1.7 Problemstellung, Hypothesen und Ziele

Das ausdauernde Weidelgras ist eine wichtige Komponente in der Wiederkäuerfütterung und ein wesentlicher Bestandteil von Rasenmischungen. Bedingt durch die weltweite Verbreitung und das allgegenwärtige Vorkommen von *L. perenne* in unserer Umwelt, ist es einem permanenten Infektionsdruck durch phytopathogene Pilze ausgesetzt. Der Befall durch *Puccinia graminis* f.sp. *graminicola* in der Grassamenvermehrung und *Puccinia coronata* f.sp. *lolii* im Anbau zur Futtergewinnung verursachen hohe Ertragsverluste. Um diese Verluste zu vermeiden und die Krankheiten zu kontrollieren, ist der Anbau von resistenten Weidelgrassorten der am meisten effiziente, ökonomische und ökologische Weg. Die hohe Reproduktionsrate und die windbürtige Verbreitung der Uredosporen über weite Strecken lässt vermuten, dass eine Vielzahl von Schwarz- und Kronenrostpathotypen in Europa vorhanden sind (Schubiger et al. 2013; Schubiger und Boller 2015). Damit ist die Wahrscheinlichkeit der Überwindung vorhandener Resistenzen durch Mutationen der Pathotypen allgegenwärtig und die Identifikation neuer wirksamer Rostresistenzen von großer Bedeutung. Ein wichtiger Aspekt bei der Züchtung resistenter Sorten ist die Beschleunigung des Zuchtprozesses durch die markergestützte Selektion. Die Identifikation von Resistenzmarkern in *L. perenne* beschränkte sich bisher auf DNA-basierte Markersysteme und QTL-Analysen („quantitative trait loci“). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Transkriptom-basierte Identifikation von resistenzassoziierten Transkripten und SNPs („single nucleotide polymorphism“), bei fehlender Genomsequenz, die Identifikation und Resistenzmarkerentwicklung beschleunigen kann (Parra-González et al. 2012; Livaja et al. 2013; Salgado et al. 2014; Fischer et al. 2015). Deshalb sollte in dieser Arbeit erstmalig die Entwicklung Transkriptom-basierter molekularer Schwarzrost-Resistenzmarker im hochgradig heterozygoten Gras, *L. perenne* von der Phänotypisierung bis zum nutzbaren Marker beschrieben werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob über eine „*in silico*“-Kartierung der resistenzassoziierten Transkripte und SNPs zusammen mit dem „perennial ryegrass GenomeZipper“ eine Lokalisation des Resistenzlokus *LpPg1* auf einer

spezifischen Kopplungsgruppe von *L. perenne* möglich ist. Über die Genexpressionsprofile der resistenten Bulks soll versucht werden auf den Resistenzmechanismus von *LpPg1* zu schließen. Neben *LpPg1* wurden zwei unterschiedliche Kronenrostresistenzen in derselben Kartierungspopulation identifiziert. Beide Kronenrostresistenzen sollen in dieser Arbeit fluoreszenzmikroskopisch charakterisiert und mittels MACE resistenzassoziierte Transkripte für eine spätere Markerentwicklung identifiziert werden.

Die Arbeiten zur Schwarz- und Kronenrostresistenz werden getrennt von einander beschrieben und die Ergebnisse im Anschluss zusammengeführt. Die vorgelegte Dissertation basiert auf folgenden Arbeiten und Hypothesen.

Basis der Untersuchungen zur Schwarz- und Kronenrostresistenz bilden die Phänotypisierungen mit Schwarz- bzw. Kronenrostfeldisolaten verschiedener Herkünfte in Form von Blattsegmenttests:

- Die Phänotypisierung der Kartierungspopulation mit Schwarz- und Kronenrostfeldisolaten zeigt eine Aufspaltung in resistente und anfällige Genotypen.
- Zwischen den Schwarz- bzw. Kronenrostfeldisolaten lassen sich Unterschiede in der Befallsstärke der Genotypen durch standortbedingt unterschiedliche Pathotypenzusammensetzungen erklären.

Mit Hilfe der Zusammenfassung von Blattsegmenten schwarzrostresistenter bzw. -anfälliger Genotypen in Form von Bulks zu verschiedenen Inokulationszeitpunkten wird die spezifische Genexpression in den Schwarzrost anfälligen und resistenten Genotypen erfasst.

- Aus der differentiellen Genexpression und SNP-Analyse zwischen resistenten und anfälligen Bulks lassen sich resistenzassoziierte Kandidatengene und SNPs identifizieren.
- Diese Gene und SNPs lassen sich als polymorphe molekulare Marker etablieren, sind mit dem Schwarzrostresistenzlokus *LpPg1* gekoppelt, in einer genetischen Karte zusammen mit *LpPg1* darstellbar, lassen eine verlässliche Unterscheidung von resistenten und anfälligen Genotypen zu, die von der Züchtung genutzt werden kann.

- Durch eine „*in silico*“-Kartierung von resistenzassoziierten Transkripten kann über die Brückenart *B. distachyon* und unter Zuhilfenahme des „perennial ryegrass GenomeZipper“ der Resistenzlokus *LpPg1* auf einer spezifischen *L. perenne*-Kopplungsgruppe lokalisiert werden.

Die Untersuchungen zur Kronenrostresistenz in der Kartierungpopulation LPSR1001 sollen eine Grundlage für eine spätere Entwicklung molekularer Kronenrostresistenzmarker sein.

Dazu werden der Zeitpunkt der Pathogenerkennung und Resistenzreaktionen durch die fluoreszenzmikroskopische Dokumentation und Auszählung der Kronenrostinfektionsstrukturen sowie die Resistenzausprägung von verschiedenen Resistenztypen erfasst.

- Die Entwicklung der Kronenroststrukturen wird in den resistenten Genotypen unterbunden bzw. die Ausbreitung im Pflanzengewebe beeinflusst.
- Genotypen lassen sich basierend auf den Infektionskurven den spezifischen Resistenztypen zuordnen.

Mit Hilfe von Genexpressionsanalysen der Kronenrostresistenztypen im Vergleich zum anfälligen Genotyp wird die resistenzassoziierte Genexpression erfasst und werden resistenzspezifische Genexpressionsprofile und Kandidatengene für eine spätere Markerentwicklung identifiziert.

- Über die resistenzassoziierten Genexpressionsprofile und Transkripte können die Resistenztypen unterschieden werden.
- Exklusiv und hochdifferentiell exprimierte resistenzassoziierte Transkripte können spezifisch für jede Kronenrostresistenz identifiziert werden.

Mit Hilfe der Korrelationsanalyse von Modalwerten aus der Schwarz- und Kronenrostresistenzphänotypisierung und dem Vergleich von exklusiven und hochdifferentiell exprimierten Transkripten in schwarz- und kronenrostresistenten Bulks/Genotypen lässt sich auf einen identischen Resistenzlokus für die Schwarz- und Kronenrostresistenz oder getrennte Resistenzloki schließen.

- Die Modalwerte der resistenten und anfälligen Genotypen sind für die Schwarz- und Kronenrostresistenz identisch. Die Vererbung beider Resistenzen erfolgt gemeinsam.

- Die differentielle Expression von schwarz- und kronenrostresistenten Genotypen ist vergleichbar.
- Aus den Genexpressionsprofilen von schwarz- und kronenrostresistenten Bulks/Genotypen lässt sich auf einen identischen Resistenzlokus schließen.

Ziel dieser Promotionsarbeit ist es:

- **Die auf Schwarzrostresistenz phänotypisierte Kartierungspopulation LPSR1001 mit aktuellen Schwarzrost-Feldisolaten zu phänotypisieren:** Dazu sollen die Genotypen mit Schwarzrostisolaten verschiedener Herkünfte inokuliert werden, um resistente und anfällige Genotypen für die Genexpressionsanalyse zu selektieren.
- **Kandidatengene und SNPs für die Schwarzrostresistenz-Markerentwicklung zu identifizieren:** Dabei sollen in Vergleichen zwischen resistenten und anfälligen Bulks, exklusiv und hochdifferentiell exprimierte Transkripte und resistenzassoziierte SNPs selektiert werden. Zusätzlich soll an Hand der Genexpressionsprofile der resistenten Bulks eine Aussage über den Resistenzmechanismus getroffen werden.
- **Molekulare Marker für die Schwarzrostresistenz zu entwickeln:** Dabei sollen die Sequenzen der Kandidatengene auf Polymorphismen in der Kartierungspopulation getestet und die Kopplung der Marker zusammen mit dem Resistenzlokus auf einer genetischen Karte dargestellt werden. Anschließend soll über den „perennial ryegrass GenomeZipper“ auf die Position von *LpPg1* auf einer spezifischen *Lolium*-Kopplungsgruppe geschlossen werden.
- **Die Kronenrostresistenzen in der Kartierungspopulation LPSR1001 zu phänotypisieren:** Dazu sollen die Genotypen mit Kronenrostisolaten verschiedener Herkünfte inokuliert werden, um resistente und anfällige Genotypen für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen und Genexpressionsanalysen zu selektieren.
- **Den Zeitpunkt der Kronenrostresistenzreaktionen einzugrenzen und den Resistenzmechanismus zu beschreiben:** Dazu soll ein Zeitreihenversuch mit kronenrostinokulierten resistenten und anfälligen

Genotypen durchgeführt und dabei die Entwicklung von Roststrukturen quantifiziert und dokumentiert werden.

- **Die Kronenrostresistenzen an Hand ihrer Genexpressionprofile zu charakterisieren und Kandidatengene für eine spätere Markerentwicklung zu identifizieren:** Dazu soll die Genexpression von kronenrostresistenten und -anfälligen Genotypen sowie von inokulierten und nicht inokulierten Zeitpunkten miteinander verglichen werden.
- **Die Schwarz- und Kronenrostresistenz auf einem identischen Resistenzloкус zu untersuchen:** Dazu sollen die Ergebnisse der Schwarz- und Kronenrost-Phänotypisierungen auf Korrelationen getestet werden und die Genexpressionsprofile schwarz- und kronenrost-resistenter Bulks/Genotypen auf Gemeinsamkeiten untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial und Rostisolate

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde die *Lolium perenne* Vollgeschwisterpopulation LPSR1001 der Saatzucht Steinach GmbH & Co KG ausgewählt. Diese Kartierungspopulation umfasst 276 Pflanzen, die einer Vollgeschwister-Kreuzung zwischen einem schwarzrostresistenten (LPSR2061 1/1) und anfälligen Genotyp (LPSR2061 1/3) der F1-Population LPSR2061 entstammen. LPSR2061 basiert auf einer Paarkreuzung von Genotypen der Sorten „Weigra“ und „Fennema“. Die Phänotypisierung auf Schwarzrostresistenz der Kartierungspopulation LPSR1001 erfolgte in einem Vorgängerprojekt (Beckmann 2010). Zur Bestätigung der von Beckmann (2010) als resistent bonitierten Genotypen wurden diese mit vier weiteren Schwarzrostisolaten im Blattsegmenttest getestet. Für die Resistenztests stellten jeweils die Saatzucht Steinach GmbH & Co KG aus Steinach (2011), William Pfender von der „USDA Forage Seed and Cereal Research Unit“ aus Corvallis/Oregon (2011), die IPK Außenstelle Malchow/Poel (2012) und die Universität Rostock (2012) ein Schwarzrostfeldisolat zur Verfügung. Die Kronenrostfeldisolate entstammen dem Zuchtgarten der Saatzucht Steinach GmbH & Co KG in Steinach (2012) und Bocksee (2013) sowie dem Versuchsgarten der Universität Rostock (2012). (Tab. 2.1). Alle Pflanzen wurden im Gewächshaus bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h bei 24°C Tag und 18°C Nacht angezogen. Die Bewässerung erfolgte täglich und die Düngung monatlich mit 0,22 g*L⁻¹ Wuxal Universaldünger (N:P:K=8:8:6) (Wilhelm Haug GmbH & Co KG, Ammerbuch-Pfäffingen).

2.2 Rostvermehrung

Die Vermehrung der Schwarz- und Kronenrostisolate erfolgte auf Blattstücken der hochanfälligen und isoliert angezogenen Sorte Aurora. Es wurden ausschließlich Blattstücken des dritten vollentwickelten Blattes eines Triebes genutzt und mit der Blattunterseite auf Agarplatten (6% Agar, 400 ppm Benzimidazol; Lellbach 1994) der Länge nach aufgelegt. Bis zur Inokulation wurden die Platten im Klimaschrank gelagert. Die bei -85°C gelagerten Rostsporen wurden für fünf Minuten bei 43°C inkubiert und anschließend in eine 10 ppm Tweenlösung gegeben und im Ultraschallbad homogenisiert (Rowell

1984). Die Inokulation erfolgte mit 10 µl Sporensuspension (100 µl Eppendorf-Pipette) im Abstand von ca. 1,5 cm (Abb. 2.1, links). In regelmäßigen Abständen wurde die Sporensuspension für eine Sekunde im Ultraschallbad homogenisiert. Nach der Inokulation wurden die Agarplatten bei 18°C und 20 Stunden Dunkelheit und anschließend bis zur Uredosporenernte bei 22°C und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h mit Zusatzbeleuchtung (Tageslichtlampen (38 W/m², 13000 lx) im Klimaschrank gelagert. Erste Uredosporenlager zeigten sich nach ca. 8 Tagen beim Kronenrost und 10 Tagen beim Schwarzrost (Abb. 2.1, rechts). Nach der Uredosporenernte erfolgte eine Trocknung auf Silicagel für zwei Tage (Fa. Roth), mit anschließender Lagerung bei -85°C.

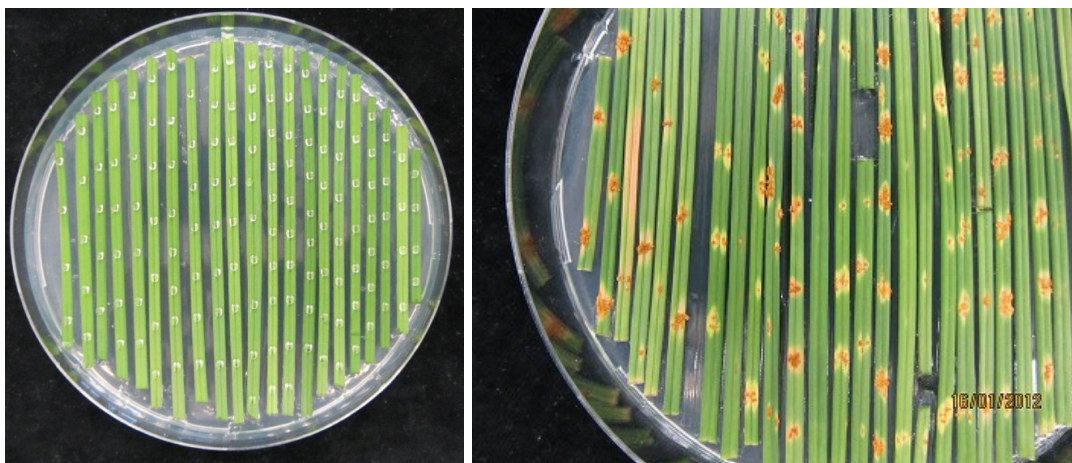


Abb. 2.1 Inokulierte Blattsegmente der hochanfälligen *Lolium perenne* Sorte Aurora mit Schwarzrost-Sporensuspension (links) und ersten Uredosporenlagern nach 10 Tagen (rechts)

2.3 Phänotypisierung

Die Phänotypisierung der Kartierungspopulation LPSR1001 wurde auf Schwarz- und Kronenrostresistenz durchgeführt. Beckmann (2010) phänotypisierte die Population bereits mit drei Schwarzrostfeldisolaten aus Deutschland (Malchow/Poel aus 2003, Bornhof und Steinach aus 2007) in einem Vorgängerprojekt (Tab. 2.1). Dabei wurde eine 1:1 Aufspaltung in schwarzrostresistente und -anfällige Genotypen festgestellt.

Eine Auswahl von 114 als schwarzrostresistent bonitierte Genotypen dieser Kartierungspopulation wurde an der Universität Rostock mit den oben beschriebenen vier Schwarzrostfeldisolaten nochmals phänotypisiert, um ausschließlich resistente Genotypen für die Genexpressionsanalyse mittels „Massive Analysis of cDNA Ends“ (MACE) zu selektieren. Die Phänotypisierung

auf Kronenrostresistenz wurde mit allen noch beim Züchter vorhandenen 282 Genotypen mit den drei Kronenrostfeldisolaten aus Deutschland (Rostock 2012, Steinach 2012 und Bornhof 2013) durchgeführt. Alle Resistenztests erfolgten nach Beckmann (2010) in Form von Blattsegmenttests. Dazu wurden Blattsegmente von zwei cm Länge vom dritten vollentwickelten Blatt jedes Genotyps entnommen und je zwei Blattstücke auf zwei runde (14 cm Ø) Agarplatten, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, nacheinander aufgelegt. Die bei -85°C gelagerten Uredosporen wurden vor der Inokulation für fünf Minuten bei 43°C inkubiert. Die Inokulation erfolgte mit einem Druckluft betriebenen Inokulationsturm mit 30 µg*cm⁻² Uredosporen bei 4 bar Luftdruck. Nach der Inokulation wurde ein feuchtes Filterpapier in die Deckel der Agarplatten gelegt. Dies gewährleistete eine hohe Luftfeuchtigkeit und eine gleichmäßige Sporenkeimung. Anschließend wurden die Agarplatten, wie in Kap. 2.2 beschrieben, bis zur Bonitur gelagert. Die Keimung der Uredosporen wurde 24 h nach Inokulation bei 200-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Nach 10 und 12 Tagen wurden die Blattsegmente nach der neunteiligen Boniturskala nach Beckmann (2010), die von 1 (keine Symptome) bis 9 (über 60% befallene Blättfläche) reicht, bonitiert. Jeder Blattsegmenttest wurde in zweifacher zeitlicher Wiederholung durchgeführt und die Boniturnoten für jeden Genotyp in einem Modalwert zusammengefasst.

Tab. 2.1 Verwendetes Pflanzen- und Uredosporenmaterial

	Schwarzrost	Kronenrost
Kartierungspopulation	LPSR1001 (406 Genotypen) Beckmann (2010)	LPSR1001 (282 Genotypen) Universität Rostock
Herkunft und Jahr der verwendeten Rostisolate	Malchow 2003, Bornhof 2007, Steinach 2007	Steinach 2012, Rostock 2012, Bocksee 2013
Test ausschließlich resistenter Genotypen	Universität Rostock (114 Genotypen)	---
Herkunft und Jahr der verwendeten Rostisolate	Steinach 2011, USA/Corvallis 2011, Malchow/Poel 2012, Rostock 2012	---

2.4 Erzeugung von Kronenrosteinsporisolaten

Für die histologischen und molekularbiologischen Untersuchungen der Kronenrost/Lolium-Interaktion wurde das Kronenrostfeldisolat aus Steinach

(2012) ausgewählt, weil es die höchste Virulenz in der Phänotypisierung zeigte. Eine Sporensuspension mit 5 Uredosporen* μl^{-1} Tween (10 ppm) Lösung wurde hergestellt und für 3 Sekunden im Ultraschallbad homogenisiert. Ein Volumen von 10 μl Sporensuspension wurde auf einen Objektträger pipettiert und einzelne Uredosporen bei 200-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop (Nikon Eclipse 6000) mit einer 2,5 μl -Pipette (Eppendorf) aufgezo-gen. Jede Spore wurde auf ein 2 cm langes, auf Agar ausgelegtes, Blattstück der Sorte Aurora pipettiert und wie in Kapitel 2.2 beschrieben im Klimaschrank gelagert. Nach 10 Tagen wurden die Sporenlager isoliert geerntet und wie in Kapitel 2.2 beschrieben vermehrt. Das Kronenrost-Einsporisolat aus Steinach (KR-SR1) wurde für die mikroskopischen Untersuchungen ausgewählt, weil dieses dieselbe phänotypische Ausprägung der Resistenztypen zeigte, wie das Feldisolat.

2.5 Mikroskopische Untersuchungen zur Kronenrostresistenz

Basierend auf den Ergebnissen der Phänotypisierung der Kronenrostresistenz wurden je ein vollständig resistenter (LPSR1001/102) (VRG), ein moderat resistenter (LPSR1001/7) (MRG) und ein anfälliger Genotyp (LPSR1001/255) (AG), der resistente Elter (LPSR2061 1/1) (RE) sowie die hochanfällige Sorte „Aurora“ ausgewählt. Diese Genotypen repräsentieren die ermittelten Kronenrostresistenztypen in der Kartierungspopulation LPSR1001. Zur Darstellung des Kronenrostinfektionsverlaufs wurden Zeitreihenversuche durchgeführt, bei denen die Rostentwicklung fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert wurde. Von jedem Resistenztyp wurden zehn Blattstücke von je zwei cm Länge des dritten jüngsten vollentwickelten Blattes eines Triebes, für jeden Zeitpunkt entnommen und, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, auf Agar ausgelegt. Anschließend wurde jedes Blattsegment mit 5 x 10 μl Tropfen der KR-SR1/Tweenlösung (10 ppm), wie in Kapitel 2.2 beschrieben, inokuliert. Die Uredosporensuspension setzte sich aus 2,5 mg Uredosporen/ml Tweenlösung (10 ppm) zusammen. Nach der Inokulation wurden die Agarplatten bei 18°C für 20 h Dunkelheit im Klimaschrank und anschließend, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, gelagert. Jede Zeitreihe erfolgte in zweifacher Wiederholung mit jeweils fünf Blattsegmenten je Wiederholung. Die Probenahme erfolgte zum Zeitpunkt 6, 12, 24, 36, 48 und 60 Stunden nach Inokulation (hpi) mit sofortiger Fixierung bei 65°C für 15 min in einer Lactophenol/Ethanollösung (v:v, 1:2)

(Rohringer et al. 1977). Bis zur Fortsetzung des Protokolls wurden die Blattsegmente in dieser Lactophenol/Ethanollösung gelagert. Die Anfärbung der Infektionsstrukturen wurde modifiziert nach Rohringer et al. (1977) durchgeführt. Die Färbedauer wurde auf 20 min in 0,1 %iger „Fluorescent Brightener 28“-Lösung (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) verlängert. Nach dreimaligem Waschen der Blattsegmente für 15 min in destiliertem Wasser und einmal für 30 min in einer gesättigten Chloralhydratlösung wurden Dauerpräparate mit Kaiserglyceringelantine hergestellt. Die Rostentwicklung wurde unter UV-Anregung an einem Nikon Eclipse 6000 D unter 400-facher Vergrößerung beifolgender Filterkombination: Anregungsfilter 380-420 nm, Sperrfilter 450 nm und dichroitischer Spiegel 430 nm dokumentiert. Zu den Zeitpunkten 6 und 12 Stunden nach Inokulation (hpi) wurde auf jedem Blattsegment die Keimfähigkeit und Appressorienbildung von 50 Uredosporen bestimmt. In Vorversuchen war die APP-Bildung zum Zeitpunkt 12 hpi beendet, deswegen erfolgte ab diesem Zeitpunkt die Auszählung der Infektionsstrukturen ausgehend von 50 APP/Blattsegment.

2.6 Massive analysis of cDNA ends (MACE)

2.6.1 Schwarzrost-MACE

Das Ziel der Schwarzrost-MACE war die Identifizierung von resistenzspezifischen Kandidatengenen für die anschließende Markerentwicklung. Die Zeitreihe zur Ermittlung von Genexpressionsprofilen zwischen schwarzrostresistenten und -anfälligen Genotypen wurde von der Saatzucht Steinach GmbH & Co KG und die Genexpressionsanalyse bei der GenXpro GmbH, Frankfurt/M., durchgeführt. Für die MACE wurden 20 resistente und 20 anfällige Genotypen selektiert. Die ausgewählten resistenten Genotypen zeigten zu keinem Zeitpunkt Symptome und die anfälligen Genotypen mindestens 60% befallene Blattfläche mit einer starken Sporulation (Abb. 2.2). Von jedem Genotyp wurden zu fünf Zeitpunkten jeweils ein Blattsegment des dritten jüngsten vollentwickelten Blattes entnommen und wie in Kapitel 2.2 beschrieben auf Agar ausgelegt. Inokuliert wurden die Blattsegmente mit dem Schwarzrostfeldisolat aus Steinach (2011), in einem druckluftbetriebenen Inokulationsturm. Vor der Inokulation wurde von jedem resistenten und anfälligen Genotyp ein Blattstück entnommen, in Form von „Bulks“ als resistente und anfällige Genotypen zusammengefasst und

unverzöglich in flüssigem Stickstoff „fixiert“. Nach der Inokulation wurden zu den Zeitpunkten 4, 8, 18 und 24 hpi Blattstücke jedes Genotyps entnommen und wie oben beschrieben in Bulks zusammengefasst und fixiert. Die Zeitpunkte 4 und 8 hpi und 18 und 24 hpi wurden nachträglich vor der RNA-Isolierung als früher und später Infektionszeitpunkt zusammengefasst (Tab. 2.2).



Abb. 2.2 Schwarzrost inokulierte resistente (links) und anfällige *Lolium perenne* Phänotypen (rechts) der Kartierungspopulation LPSR1001 10 Tage nach Inokulation

2.6.2 Kronenrost-MACE

Die Zeitreihe zur Charakterisierung der Kronenrostresistenztypen wurde wie in Kapitel 2.5 beschrieben durchgeführt. Dazu wurden die *Lolium*-Genotypen vollständig resistent (VRG), moderat resistent (MRG), und anfällig (AG) sowie der resistente Elter LPSR2061 1/1 (RE) ausgewählt und mit KR-SR1 inokuliert. Im Gegensatz zur Schwarzrost-MACE wurden von den Blattstücken ausschließlich die inokulierten Bereiche mit einem in flüssigem Stickstoff gekühltem Korkbohrer ausgestanzt, um möglichst die Genexpression von resistenzspezifischen Transkripten zu erfassen und einen möglichen Verdünnungseffekt durch nicht infizierte Bereiche auszuschließen. Die

ausgestanzten Blattstücke wurden unverzüglich in einem in flüssigem Stickstoff gelagerten Cryoröhrchen (Fa. Carl Roth, Deutschland) eingefroren und bei -85°C gelagert. Die Probenahmen erfolgten unmittelbar vor der Inokulation sowie 6, 12 und 24 hpi (Tab. 2.2).

Tab. 2.2 Vergleichende Darstellung der Schwarz- und Kronenrost-MACE Experimente

	Schwarzrost	Kronenrost
Ziel	Resistenzmarker-Entwicklung	resistenzspezifische Genexpression
ausgewählte Genotypen	20 resistente Genotypen (0 % befallene Blattfläche) 20 anfällige Genotypen (≥ 60 % befallene Blattfläche)	vollständig resistenter Genotyp (0 %) resistenter Elter (0 %) moderat resistenter Genotyp (>5 – 10 %) anfälliger Genotyp (≥ 60 %)
Verwendetes Rostisolat	Feldisolat Steinach (2011)	Einsporisolat (KR-SR1) aus Steinach (2012)
Probenmaterial	Blattsegmente als Bulks	ausgestanzte inokulierte Blattbereiche je Genotyp
Zeitpunkte der Probenahme	nicht inokuliert, 4 hpi, 8 hpi, 18 hpi, 24 hpi	nicht inokuliert, 6 hpi, 12 hpi, 24 hpi
cDNA Banken	<u>Bulks:</u> nicht inokuliert anfällig nicht inokuliert resistent früher Zeitpunkt anfällig (4 + 8 hpi) früher Zeitpunkt resistent (4 + 8 hpi) später Zeitpunkt anfällig (18 + 24 hpi) später Zeitpunkt resistent (18 + 24 hpi)	<u>Genotypen:</u> vollständig resistent, moderat resistent, anfällig und der resistente Elter <u>Zeitpunkte:</u> nicht inokuliert 6 hpi 12 hpi 24 hpi

2.6.3 RNA-Isolierung, Reverse Transkription und Sequenzierung

Bei der GenXPro GmbH wurde die RNA-Isolierung durchgeführt. Die Blattsegmente wurden in flüssigem Stickstoff gemahlen und die RNA mit dem RNeasy Plant Extraktionskit (Qiagen, Deutschland) extrahiert und mittels polyadenylierter RNA durch Dynabeads Oligo-dt (life technology, USA) nach Angaben des Herstellers isoliert.

Die cDNA-Banken wurden nach Zawada et al. (2014) generiert. cDNA von 5 µg RNA wurde willkürlich fragmentiert und die biotinylierten 3'-Enden an eine Streptavidin-Matrix gebunden. Zur Hochdurchsatzsequenzierung (Illumina HiSeq 2000) wurden die cDNA-Banken mit TrueQuant-Adaptoren (GenXPro GmbH) prepariert. Die cDNA-Banken bestanden aus Sequenzen von 50 bis 600 Basenpaaren (bp) von 3'-Enden abgeleiteten Fragmenten. Zur Erzeugung von MACE-Sequenzen (reads) wurden die 5'-Enden der cDNA-Banken mit 100 Zyklen im HiSeq 2000 sequenziert. Jede Sequenz repräsentiert ein einzelnes Transkriptmolekül, deren erste sechs Basenpaare einen Barcode enthalten. Die tatsächliche Länge der MACE-Sequenzen (reads) erreicht 94 bp. Die Sequenzdaten der Schwarzkorn-MACE sind in der NCBI BioProject-Datenbank unter der Akzessionsnummer PRJNA317520 hinterlegt. Die bei der Korn-MACE ermittelten Sequenzdaten wurden bisher nicht veröffentlicht.

2.6.4 Bioinformatik

Die reads wurden anschließend in der Bioinformatik bearbeitet. Dabei wurden zur Entfernung des PCR-Bias alle von der True Quant-Technologie (GenXPro GmbH) identifizierten Duplikate vom Rohdatensatz entfernt. Sequenzen mit geringer Basenqualität wurden gekappt und der Poly-A-Schwanz abgeschnitten. Die qualitativ hochwertigen reads wurden anschließend mit der GenXPro-eigenen nicht publizierten RNASeq-Sammlung von *L. perenne* abgeglichen. Alle reads der Proben, die nicht annotiert werden konnten, wurden zu einer Referenzdatenbank zusammengesetzt. Die Sequenzen der zusammengesetzten reads wurden zur Swissprot (Boeckmann et al. 2005) und NCBI-„Viridiplantae“-Datenbank durch BLASTX (Altschul et al. 1990) annotiert und anschließend als Referenz für die Annotierung und Quantifizierung der MACE-Sequenzen genutzt. Ausschließlich eindeutig zugeordnete reads wurden weiter genutzt.

2.7 Validierung von ausgewählten Sequenzen der Schwarzrost-MACE mittels quantitativer qRT-PCR

Zur Bestätigung der Genexpressionsanalyse in der Schwarzrost-MACE wurden acht Transkripte aus der MACE ausgewählt (Tab. 2.3) und mit der quantitativen „Real Time-Polymerase Chain Reaction“ (qRT-PCR) auf Reproduzierbarkeit getestet. Von diesen acht Transkripten wurden fünf exklusiv nur in den resistenten Genotypen und drei zwischen den resistenten und anfälligen Bulks hochdifferenziell exprimiert. Basierend auf den MACE-Sequenzen wurden spezifische Primer mit dem Programm Primer-Blast von NCBI erstellt (Ye et al. 2012). Als Referenzgen wurde aus den MACE-Sequenzen das Elongationsfaktor 1-alpha-Gen (*ELF-1 α*) gewählt, dessen Expression über alle Versuchsbedingungen konstant war. Die Zeitreihe wurde in einem unabhängigen Experiment in Rostock, wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben, wiederholt.

2.7.1 RNA Isolierung und Umschreiben der RNA in cDNA

Für die RNA-Isolierung wurden die Bulks aus 4 und 8 hpi und 18 und 24 hpi analog zu Kapitel 2.6.3 zusammengefasst und mit Mörser und Stößel in flüssigem Stickstoff homogenisiert. Von 100 mg Pflanzenmaterial wurde mit dem RNease-Plant Minikit (Fa. Qiagen, Deutschland) die RNA isoliert und anschließend mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Fa. Qiagen, Deutschland) in cDNA übersetzt. Die Arbeiten erfolgten entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

2.7.2 Primer und qRT-PCR-Protokoll

Der Mastermix setzte sich aus 1 ng cDNA und dem SYBR Green PCR-Mastermix (Qiagen, Deutschland) nach Vorgabe des Herstellers zusammen. Im Rotor-Gene Q MDx (Qiagen, Deutschland) qRT-PCR-Cycler wurden die Proben der Reihe nach in einem 72 Proben fassenden Rotor eingesetzt und die PCR nachfolgendem Programm ausgeführt: 90°C für 5 min, gefolgt von 40 Zyklen für 5 sec bei 90°C und 10 sec bei 60°C. Jedes Primerpaar und jede Probe wurde in dreifacher technischer Wiederholung quantifiziert und die Primerspezifität bei jedem Lauf mit einer Negativkontrolle überprüft (Tab. 2.3).

Tab. 2.3 Primersequenzen ausgewählter MACE-Transkripte zur Validierung der Schwarzrost-MACE-Ergebnisse mittels qRT-PCR

Primer	Gen-Identifikat-ion	Beschreibung	Sequenz 5'-3'	Produkt-länge (bp)
ERT1-f ERT1-r	LoliumRes_a 230215_7	Disease resistance protein RGA2 (<i>Solanum bulbocastanum</i>)	AGGCTTTGCTCACAGTACCC GGGACCGCAAGAACTTCTCA	111
ERT2-f ERT2-r	LoliumRes_a 549699_4	Putative disease resistance protein RGA1 (<i>S. bulbocastanum</i>)	AAGGTTGAGCTGCTGAGGAC ACACATCCACCCATGCTCTG	163
ERT3-f ERT3-r	LoliumRes_a 783434_3	PREDICTED: <i>Brachypodium distachyon</i> disease resistance RPP8-like protein 3-like (LOC100827328), mRNA;	CTTGACTCCTGTCCGCATGA CTTTGGAAAAGCCAGGCAGT	174
ERT4-f ERT4-r	LoliumRes_a 924483_3	Disease resistance RPP13-like protein 4 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	ACACTGCCTGTTTTGGCTCA ACGGACCCTGATGTAGTCCT	156
ERT5-f ERT5-r	LoliumRes_a 48290_26	RPM1_ARATH Disease resistance protein RPM1 (<i>A. thaliana</i>)	GTTCAGAACAGATGCATGTAC G AGACGAGAGTTGGAAGCACC	101
LoRes1-f LoRes1-r	LoliumRes_a 2363_425	Premnaspirodiene oxygenase (<i>Hyoscyamus muticus</i>)	AGCCGCGTAAATAAACAGGG GATTCCCCCTGCAGTTTCCC	65
LoRes2-f LoRes2-r	LoliumSus_a 50225_89	Thaumatococcus-like pathogenesis-related protein 4 (<i>Avena sativa</i>)	ACGTCAAGACCAAAACCTGC CGTGTGTGCACCGATTGTTC	177
LoRes3-f LoRes3-r	LoliumRes_a 18580_131	Pathogenesis-related protein PRB1-2 (<i>Hordeum vulgare</i>)	ACGCCGAAGCCAAGTAGTC CATTGCCACGGATACAGCAG	104
Elf1 α -f Elf1 α -r	LoliumRes_a 507_2186	Elongation factor 1-alpha (<i>H. vulgare</i>)	TCGACTCTGGCAAGTCAACC CTCAGCGGCTTCCTCTCAA	98

2.8 Statistische Methoden

Vergleiche zwischen den Modalwerten der Phänotypisierungen der einzelnen Rostisolate wurden mit der Rangkorrelationsanalyse nach Spearman und Signifikanzen mit Tukey's HSD *post hoc*-Test auf Ränge berechnet. Signifikante Unterschiede in der Kronenrostentwicklung ausgewählter Resistenztypen wurde mit dem Kruskal-Wallis Test und multiple Vergleiche mit Tukey's HSD *post hoc*-Test berechnet (Mendiburu 2016). Die Auswertung erfolgte mit der Softwareumgebung R (Version 3.3.0, R Development Core Team 2008). Neben den Standardpaketen wurde das Paket „agricolae“ (Version 1.2-4) genutzt. Die Normalisierung und die Tests auf differentielle Genexpression zwischen den Bulks der Schwarzrost-MACE bzw. den Genotypen der Kronenrost-MACE wurden bei der GenXpro GmbH mit dem Paket DEGSeq R/Bioconductor (Wang

et al. 2010) berechnet. Die Selektion von resistenzassoziierten Genexpressionsprofilen und Transkripten wurde mit der „*Gene Ontology*“ (GO) Analyse („Gene Ontology Enrichment Analysis Tool“) durchgeführt. In der GO „biological process“ wurden GO-Begriffe mit signifikant differentieller Genexpression auf Grundlage des nach Fischer berechneten p-Werts selektiert. Anschließend wurde auf GO-Begriffe mit Annotation zur Pflanzenabwehr und Wirt/Parasit-Interaktion selektiert. Die dazu genutzten GO-Begriffe basieren auf GO-Analysen von Resistenzen und Wirt/Pathogen-Interaktionen in wissenschaftlichen Artikeln und auf GO-Begriffen, die vom „Plant-Associated Microbe Gene Ontology (PAMGO) Consortium“ entwickelt wurden (Chibucos et al. 2009; Meng et al. 2009; Torto-Alalibo et al. 2009).

Um SNPs zwischen den Sequenzen der resistenten und anfälligen Bulks in der Schwarzrost-MACE zu identifizieren, wurde das Programm SNVmix genutzt (Goya et al. 2010). Alle Contigs, die SNPs beinhalteten, wurden auf das *Brachypodium distachyon*-Genom annotiert. Dieses wurde in 50 Abschnitte aufgeteilt und die Frequenz der Contigs mit SNPs gezählt. Diese SNPs wurden als „resistenzassoziierte SNPs“ bezeichnet. Mit den Sequenzen der exklusiv nur in den resistenten Bulks vorkommenden Transkripten (ETRs) wurde ebenso verfahren. Anschließend wurden die Sequenzen auf die *Brachypodium*-Chromosomen aufgetragen.

Die Ct-Werte aus der qPCR wurden basierend auf der PCR-Effizienz und dem Referenzgen (*ELF-1 α*) normalisiert. Mit dem „Pair-Wise Fixed Reallocation Randomization Test“ des Softwareprogramm REST 2009 (Pfaffl et al. 2002) wurde die x-fache Expression zum Vergleichspartner logarithmiert zur Basis 2 (log₂FC) zwischen den anfälligen und resistenten Bulks bestimmt und auf signifikant differentielle Genexpression getestet.

3 Ergebnisse

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen zur Resistenz gegenüber Schwarzrost (*Puccinia graminis* f. sp. *graminicola*) und Kronenrost (*Puccinia coronata* f. sp. *lolii*) in *Lolium perenne* gliedern sich in zwei separate Teile. Die Resistenzuntersuchungen gegenüber den Rostkrankheiten werden getrennt von einander analysiert und anschließend Gemeinsamkeiten und Unterschiede dargestellt. Den ersten Teil zur Schwarzrostresistenz bildet die Phänotypisierung vorselektierter Genotypen der Kartierungspopulation LPSR1001 mit vier verschiedenen Schwarzrost-Feldisolaten, die die Basis für die Auswahl der Genotypen für die molekulargenetischen Genexpressionsanalysen bildet. Im zweiten Teil wird die Überexpression von Transkripten anfälliger und resistenter Bulks verglichen, Kandidatengene selektiert und darauf basierend Marker entwickelt. Abschließend werden alle polymorphen Marker zusammen mit *LpPg1* in einer Kopplungskarte zusammengefasst und versucht die spezifische Kopplungsgruppe, auf der sich *LpPg1* befindet, zu bestimmen.

Die Untersuchungen zur Kronenrostresistenz beziehen sich im ersten Teil auf die Phänotypisierung der Kartierungspopulation und auf die fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung der resultierenden Resistenztypen. Im zweiten Teil wird die Genexpression der Resistenztypen mit einem anfälligen Genotyp und untereinander verglichen.

3.1 Schwarzrostresistenz

3.1.1 Phänotypisierung der Kartierungspopulation LPSR1001 auf Schwarzrostresistenz

Von den auf Schwarzrostresistenz vorselektierten 114 Genotypen zeigten im Mittel über alle Schwarzrostisolate 49 Genotypen keine Sporulation (Boniturnote 1), 27 ein bis fünf Uredosporenlager pro Blattsegment (Boniturnote 2) und 38 eine Sporulation auf mehr als 5% der Blattsegmentfläche. Die Verteilung der Modalwerte zwischen den Schwarzrostisolaten zeigte eine hohe Korrelation von 0,64, 0,69 und 0,70. Signifikante Unterschiede zwischen den Schwarzrostisolaten waren nicht nachweisbar (Tab. 3.9). Die höchsten Korrelationskoeffizienten von 0,70 wurden für die Schwarzrostisolate Steinach-USA, Malchow/Poel-Rostock und Rostock-USA berechnet, der geringste

Korrelationskoeffizient mit 0.64 für die Isolate Steinach-Malchow/Poel. Das Feldisolat aus Steinach ist mit 11 hoch anfälligen Genotypen (>40% befallene Blattfläche) das Schwarzrostisolat mit der höchsten Virulenz (Abb. 3.1).

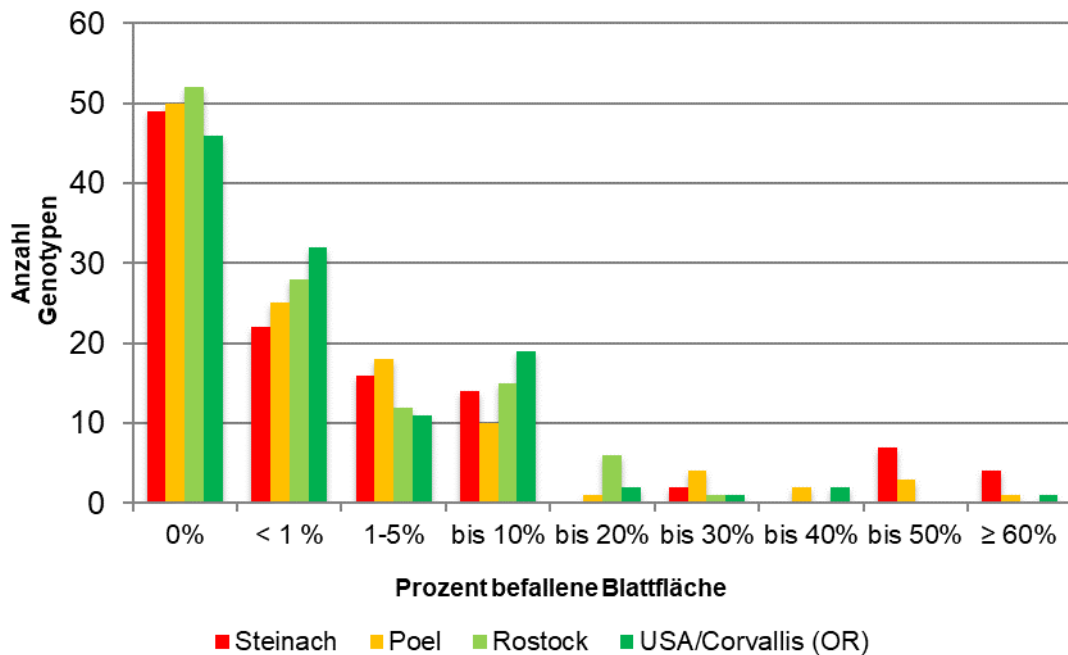


Abb. 3.1 Häufigkeitsverteilung der Boniturmodalwerte von 114 *Lolium perenne*-Genotypen der Kartierungspopulation LPSR1001 inokuliert mit vier Schwarzrostfeldisolaten in vierfacher Wiederholung

3.1.2 Schwarzrost-MACE

Auf Grund der 1:1 Aufspaltung der Population in resistente und anfällige Genotypen (Beckmann 2010) wurde von einer monogenen Resistenz ausgegangen und Bulks aus 20 vollständig resistenten (Boniturnote 1) und 20 hochanfälligen Genotypen (Boniturnote 9) gebildet (Abb. 2.2). Zum Vergleich der Genexpressionsprofile und zur Identifikation von resistenzassoziierten Transkripten wurden alle Zeitpunkte der resistenten Bulks (ResAll) und analog der anfälligen Bulks (SusAll) bioinformatisch zusammengefasst und einzeln als ResAll und SusAll miteinander verglichen.

3.1.2.1 „Gene Ontology“-Analyse signifikant überexprimierter Transkripte im schwarzrostresistenten Bulk (ResAll)

Die signifikant überexprimierten Transkripte in ResAll sind nach ihrer biologischen Funktion zusammengefasst und wurden fünf zur pflanzlichen Abwehr zählenden GOs zugeordnet (Tab. 3.1). Diese Transkripte sind am Zelltod anderer Organismen und am Ab- bzw. Umbau der Zellwand beteiligt.

Tab. 3.1 „Gene Ontology“ signifikant überexprimierter Transkripte in allen resistenten *Lolium perenne*-Bulks (ResAll) zusammengefasst nach ihrer biologischen Funktion in GOs

Gene Ontology- Identifikation	Bezeichnung	log2FC
GO:0009830	cell wall modification involved in abscission	2,3
GO:0044277	cell wall disassembly	2,3
GO:0031640	killing of cells of other organism	2,2
GO:0001906	cell killing	2,2
GO:0044364	disruption of cells of other organism	2,2

3.1.2.2 Differenziell exprimierte Transkripte und SNPs zwischen ResAll und SusAll

Über alle Zeitpunkte wurden 1370 Transkripte signifikant differentiell exprimiert ($\log_2FC \geq 2$, $\log_2FC \leq -2$; $p < 0,01$). Davon wurden 517 im resistenten und 853 im anfälligen Bulk überexprimiert. Basierend auf den fünf GOs, die im resistenten Bulk über alle Zeitpunkte überexprimiert sind, wurden 12 Transkripte mit Annotation zu Abwehrreaktionen bei Pflanzen identifiziert ($p < 0,01$; $FDR < 0,001$) (Tab. 3.2). Diese Transkripte zeigen Homologie zu Genen, die weitreichende resistenzspezifische Funktionen von der Pathogenerkennung bis zur Phytoalexinproduktion erfüllen. Zusätzlich wurden 401 nahezu exklusiv exprimierte Transkripte und 330 SNPs in 178 Transkripten identifiziert, die ausschließlich in den resistenten Bulks vorkamen. Von den 401 Transkripten wurden 341 ausschließlich in den resistenten Bulks exprimiert.

Tab. 3.2 Signifikant überexprimierte Transkripte mit Annotation zur Pflanzenabwehr in allen schwarzrostresistenten *Lolium perenne*-Bulks (ResAll)

Gen-Identifikation	Gen-Bezeichnung	log2FC
LoliumRes_a48290_26	Disease resistance protein RPM1 (<i>A. thaliana</i>)	8,9
LoliumRes_a37859_64	Transcription factor TGA4 (<i>A. thaliana</i>)	5,8
LoliumRes_a91747_18	Disease resistance RPP8-like protein 3-like (BRADI1G34430) (<i>B. distachyon</i>)	5,8
LoliumRes_a2363_425	Premnaspirodien oxygenase (<i>Hyoscyamus muticus</i>)	5,8
LoliumRes_a30151_42	Reticuline oxidase-like protein (<i>A. thaliana</i>)	3,5
LoliumRes_a18580_13 1	Pathogenesis-related protein PRB1-2 (<i>H. vulgare</i>)	3,4
LoliumRes_a22756_71	Red chlorophyll catabolite reductase (Fragment) (<i>H. vulgare</i>)	3,3
LoliumRes_a61717_25	Probable receptor-like protein kinase At5g47070 (<i>A. thaliana</i>)	2,9
LoliumRes_a25059_69	Vacuolar-sorting receptor 6 (<i>A. thaliana</i>)	2,5
LoliumRes_a55220_24	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 15a (<i>A. thaliana</i>)	2,3
LoliumRes_a32737_43	Probable disease resistance RPP8-like protein 2 (<i>A. thaliana</i>)	2,2
LoliumRes_a71891_29	Probable histone deacetylase 19 (<i>Z. mays</i>)	2,0

3.1.2.3 „in silico“-Kartierung von ETRs und SNPs in *Brachypodium distachyon* und *Lolium perenne*

Die ETRs und Transkripte mit SNPs wurden anschließend mit dem Referenzgenom von *Brachypodium distachyon* abgeglichen und die chromosomale Position von homologen Sequenzen bestimmt. Von den 401 nahezu exklusiven Transkripten wurden 131 dem *B. distachyon*-Genom zugeordnet (Abb. 3.2). Davon wurden 64 Transkripte zu Chromosom 1 von *B. distachyon* (Bd1) und die zweitgrößte Gruppe mit 25 Transkripten Chromosom 4 (Bd4) zugeordnet. Acht ETRs zeigten Sequenzhomologie zu Resistenzgenen, die auf Bd1, 4 und 5 lokalisiert wurden (Tab. 3.3). Von den Transkripten mit SNPs wurden 52 dem *B. distachyon*-Genom zugeordnet, davon 19 zu Bd1 und 17 zu Bd3 (Abb. 3.2). Die ETRs und SNPs auf Bd1 beschränken sich auf einen begrenzten Bereich von 26,0 bis 34,5 Mbp (Abb. 3.3). Dieser Bereich auf Bd1 zeigt im "Perennial ryegrass GenomeZipper" (Pfeifer et al. 2013) Makrosyntenie zu *L. perenne*-Kopplungsgruppe 7 (LG7). Sequenzen von ETRs und SNPs mit Mikrosyntenie von *B. distachyon* zu *L. perenne* waren nicht vorhanden. Daraufhin wurden die Sequenzen der polymorphen Marker aus der genetischen Kartierung

genutzt und mit dem Syntenie-basierten Gerüst-Genom von Byrne et al. (2015) abgeglichen. Sequenzen von 18 Markern zeigten Homologie zu Gerüstsequenzen, von denen die meisten auf den *Lolium*-Kopplungsgruppen 2 (LG) und 7 lokalisiert wurden. Der co-segregierende Marker *LpERT_18* zeigte Sequenzhomologie zur Gerüst-Sequenz: scaffold_3494_ref001884 bei 78 cM auf LG2. Für die flankierenden Marker *LpETR_17* und *LpETR_19* wurde keine Sequenzhomologie identifiziert.

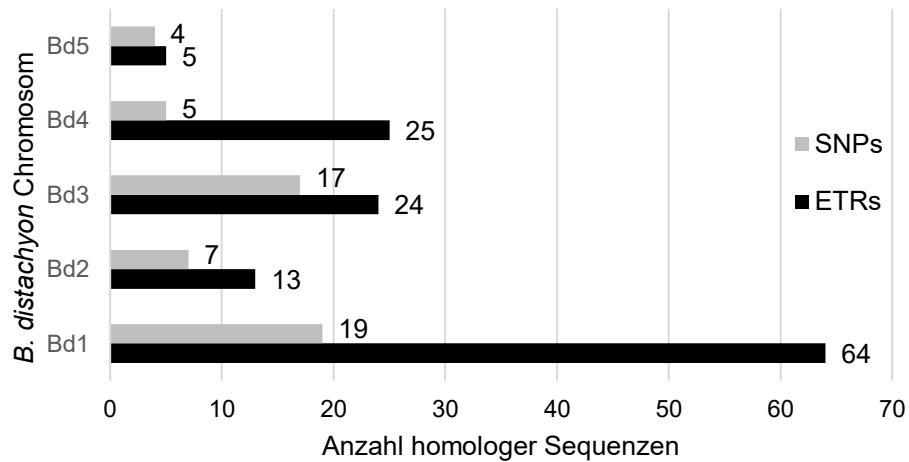


Abb. 3.2 Anzahl exklusiver Transkripte der schwarzrostresistenten *Lolium perenne*-Bulks und SNPs mit Sequenzhomologie zu *Brachypodium distachyon*-Chromosomen

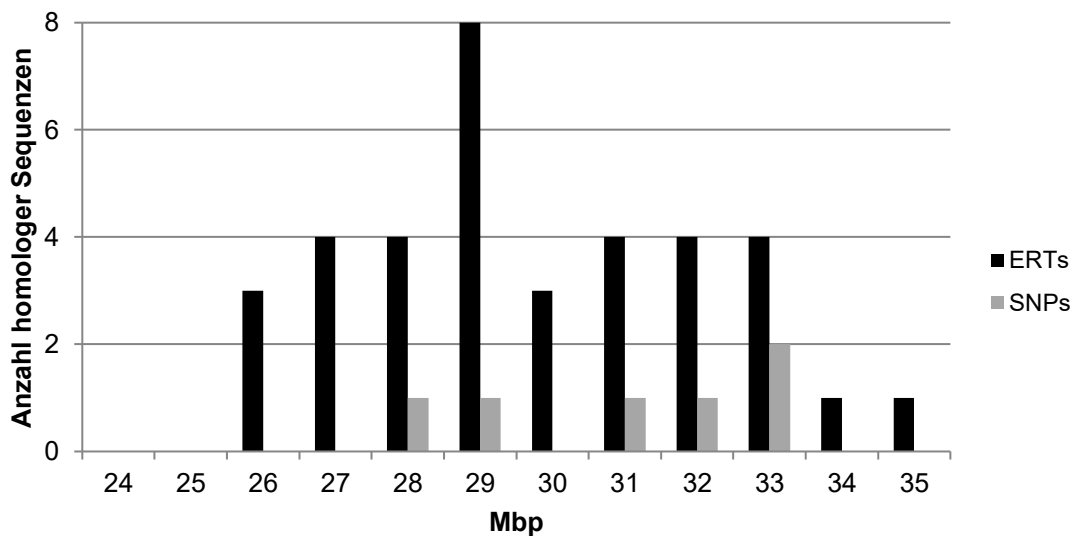


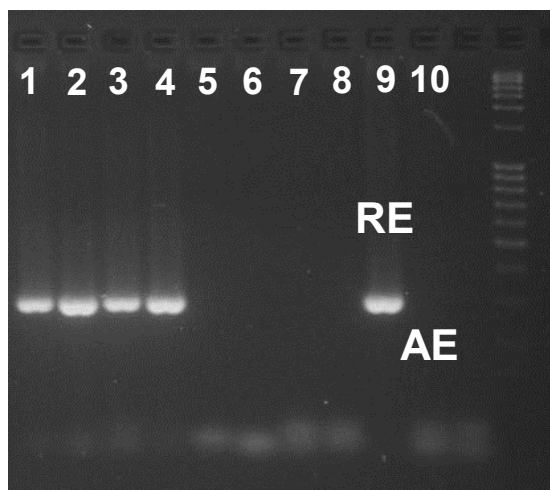
Abb. 3.3 Anzahl von SNPs und exklusiv exprimierten Transkripten der resistenten Bulks von *Lolium perenne* zwischen 26,0 - 34,5 Mbp auf *Brachypodium distachyon*-Chromosom 1 (Bd1)

Tab. 3.3 Exklusive Transkripte der resistenten *Lolium perenne*-Bulks mit Sequenzhomologie zu Resistenzgenen und Zuordnung zum Referenzgenom von *Brachypodium distachyon*

Gen-Identifikation	Gen-Beschreibung	<i>B. distachyon</i> Chr.
LoliumRes_a783434_3/ <i>LpETR_18</i>	Disease resistance RPP8-like protein 3-like (LOC100827328) (<i>B. distachyon</i>)	1
LoliumRes_a91747_18	Disease resistance RPP8-like protein 3-like (LOC100827328) (<i>B. distachyon</i>)	1
LoliumRes_a330668_9	Disease resistance protein RPM1-like (LOC100844311) (<i>B. distachyon</i>)	4
LoliumRes_a549699_4/ <i>LpETR_19</i>	Putative disease resistance protein RGA1 (<i>S. bulbocastanum</i>)	4
LoliumRes_a775259_4	Disease resistance protein RGA2-like (LOC100828116) (<i>B. distachyon</i>)	4
LoliumRes_a924483_3/ <i>LpETR_17</i>	Disease resistance protein RPM1-like (LOC100844311) (<i>B. distachyon</i>)	4
LoliumRes_a48290_26/ <i>LpETR_1</i>	Disease resistance protein RPM1 (<i>A. thaliana</i>)	5
LoliumRes_a230215_7	Disease resistance protein RGA2 (<i>S. bulbocastanum</i>)	NA

3.1.2.4 Genetische Kartierung von MACE basierten ETRs und SNPs der schwarzrostresistenten Bulks

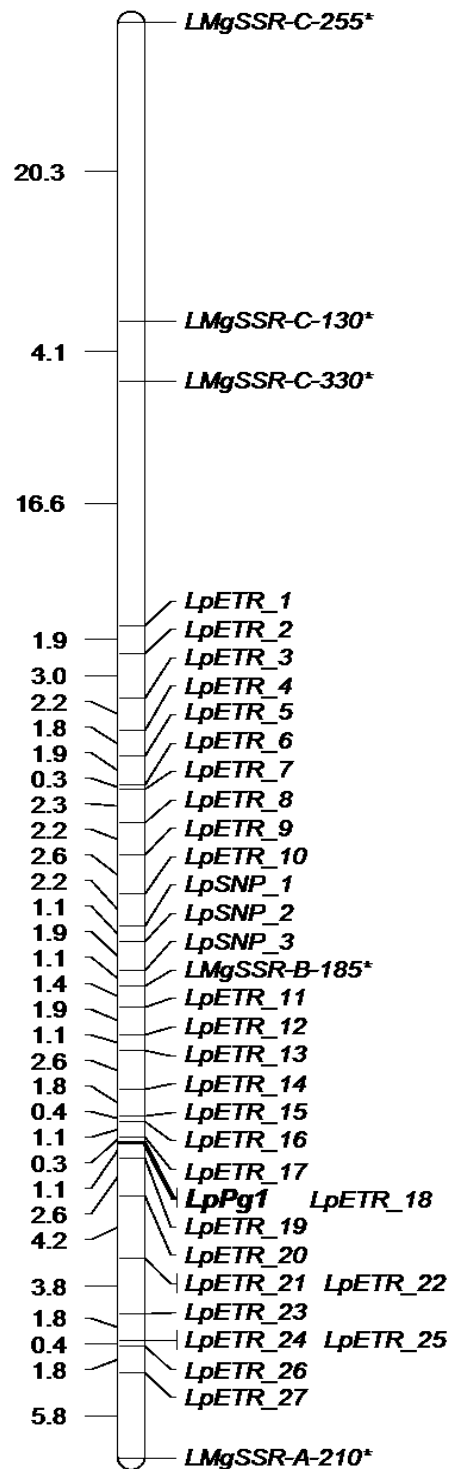
Die Kartierung von *LpPg1* basierte auf der Vollgeschwister Kartierungspopulation LPSR1001 (N = 267). Für 87 ETRs und fünf SNPs, die den *B. distachyon* Chromosomen 1, 4 und 5 zugeordnet werden konnten, wurden Primer designt. Davon zeigten 83 Primerpaare ein Amplifikat und 30 einen Polymorphismus zwischen den resistenten und anfälligen Genotypen (Abb. 3.4, siehe Anhang A1).



Spalte 1-4: resistente Genotypen mit *LpPg1*-Resistenz, Spalte 5-8: vier anfällige Genotypen ohne *LpPg1*-Resistenz, Spalte 9: der resistente Elter (RE) und Spalte 10: der anfällige Elter (AE)

Abb. 3.4 Gelbild mit PCR-Produkten des co-segregierenden Marker *LpETR_18* von vier resistenten Genotypen mit *LpPg1*-Resistenz, vier anfälligen Genotypen ohne *LpPg1*-Resistenz, dem resistenten Elter und dem anfälligen Elter

Zusätzlich zu den polymorphen Markern wurden fünf „simple sequence repeat“ (SSR) Ankermarker, die bereits von Beckmann et al. (2010) zur Kartierung von *LpPg1* genutzt wurden, in die Kartierung aufgenommen. Daraus wurde eine genetische Karte mit einer Distanz von 97,6 cM generiert, die den Resistenzlokus *LpPg1* mit 35 Marker umfasst (Abb. 3.5). *LpPg1* wird von *LpETR_17* mit 0,3 cM proximal und von *LpETR_19* mit 1,1 cM distal flankiert. Der ETR Marker *LpETR_18* co-segregierte mit *LpPg1*.



* Ankermarker aus Hirata et al. (2006), genutzt von Beckmann et al. (2010)

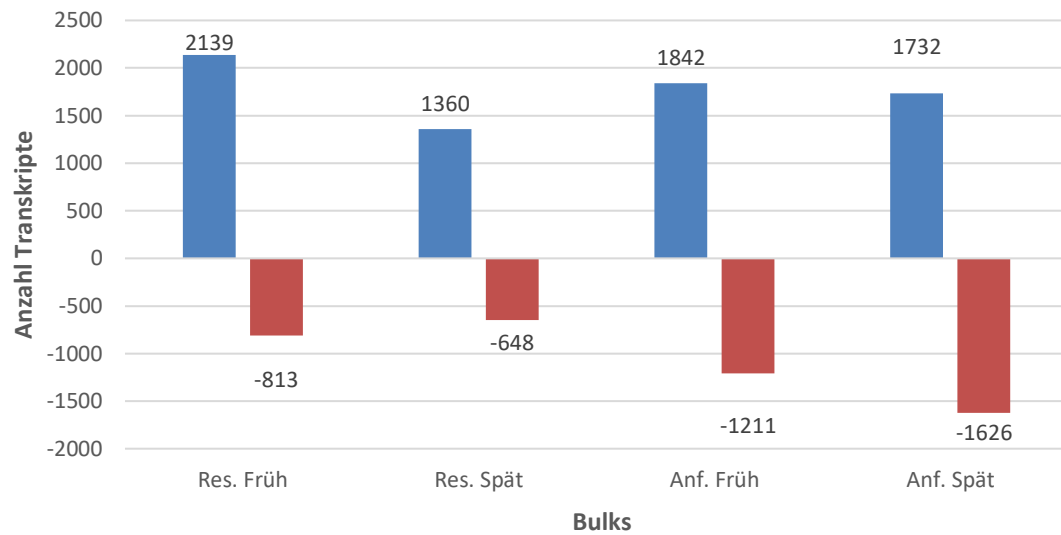
Abb. 3.5 Genetische Karte vom Resistenzlocus *LpPg1* mit ETR- und SNP-Markern aus der Schwarzrost-MACE

3.1.2.5 Inokulationsbedingte Überexpression abwehrinduzierter

Transkripte in den schwarrostresistenten und -anfälligen Bulks zusammengefasst in „Gene Ontology“

Zur Identifikation von Transkripten, die durch die Rostinokulation überexprimiert wurden, sind die inokulierten mit dem nicht inokulierten Zeitpunkt verglichen worden. In Abbildung 3.6 ist die Anzahl hoch- bzw. runterregulierter Transkripte zum jeweiligen Zeitpunkt dargestellt. In der GO-Analyse der inokulierten Zeitpunkte wurde ausschließlich zum späten Zeitpunkt im resistenten Bulk abwehrspezifische GOs identifiziert. Diese GOs sind: “cell killing”, “disruption of cells of other organism”, “killing of cells of other organism” und entsprechen damit, den bereits im Vergleich von resistent mit anfällig identifizierten GOs.

Die in diesen und weiteren abwehrspezifischen GOs zusammengefassten Transkripte sind in Tabelle 3.4 nach ihrer Funktion, basierend auf der Uniprot-Datenbank, sortiert und für den frühen und späten Zeitpunkt jedes Bulks dargestellt. Insgesamt ist ein Anstieg von Transkripten mit Homologie zu “disease resistance” Genen, “pathogenesis related” und antifungalen Proteinen in den inokulierten Zeitpunkten zu verzeichnen. In den resistenten Bulks wurden, im Vergleich zu den anfälligen Bulks, besonders Transkripte mit antifungalen Funktion, wie “barwin”, “wheatwin” und “glucan endo-1,3-glukosidasen” überexprimiert. Als zweitgrößte Gruppe wurden Transkripte mit Annotation zur Signalübertragung und Transkription in den inokulierten Zeitpunkten überexprimiert. Diese codierten für Transkriptionsfaktoren, Proteinkinasen und Proteine, die in der RNA-Verarbeitung involviert sind. Gemeinsamkeiten in den resistenten und anfälligen Bulks wurden bei Transkripten mit Funktion im Transport- und Lipidmetabolismus identifiziert. Diese waren zu allen untersuchten Zeitpunkten mit ähnlichen Expressionsraten durch die Rostinokulation induziert. Zusätzlich zu den beschriebenen Transkripten wurden mehrere mit unbekannter Funktion, die aber in Zusammenhang mit Abwehrreaktionen von Pflanzen in Verbindung stehen, überexprimiert.



(log2FC ≥ 2 , ≤ -2 ; $p < 0.01$, FDR < 0.001)

Abb. 3.6 Anzahl signifikant überexprimierter und runterregulierter *Lolium perenne*-Transkripte in den inokulierten schwarzrostresistenten und -anfälligen Bulks im Vergleich zum nicht inokulierten Zeitpunkt

Tab. 3.4 Abwehrspezifische Transkripte induziert durch die Inokulation mit Schwarzrosturedosporen in den resistenten und anfälligen *Lolium perenne*-Bulks

Gen- Identifikation	Gen- Beschreibung	resistente Bulks		anfällige Bulks	
		log2FC früher Zeitpunkt	log2FC später Zeitpunkt	log2FC früher Zeitpunkt	log2FC später Zeitpunkt
Abwehr und Stress induzierte Transkripte					
LoliumSus_a1803_818	Barwin (<i>H. vulgare</i>)	2,1	1,2	0,0	-1,2
LoliumRes_a1192_855	Barwin (<i>H. vulgare</i>)	2,3	1,4	0,0	-1,2
LoliumRes_a117549_14	Disease resistance protein RGA2 (<i>S. bulbocastanum</i>)	-0,7	-0,7	3,9	3,9
LoliumSus_a110432_14	Disease resistance protein RPM1 (<i>A. thaliana</i>)	0,7	0,7	3,6	3,7
LoliumRes_a11357_126	Disease resistance response protein 206 (<i>P. sativum</i>)	2,1	0,4	0,5	-0,5
LoliumRes_a23369_55	Disease resistance RPP13-like protein 4 (<i>A. thaliana</i>)	2,4	1,4	0,0	-0,8
LoliumRes_a1047_723	Endochitinase A (<i>Z. mays</i>)	2,4	1,8	0,1	-0,7
LoliumRes_a372729_5	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 13 (<i>A. thaliana</i>)	-0,3	-0,9	2,8	1,8
LoliumSus_a4992_372	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 13 (<i>A. thaliana</i>)	6,1	7,0	-0,8	0,1
LoliumRes_a5216_338	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 13 (<i>A. thaliana</i>)	6,4	7,4	-0,9	0,1
LoliumRes_a6165_237	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GII (<i>H. vulgare</i>)	0,7	0,4	2,4	1,3
LoliumRes_a9509_159	Glutathione transferase GST 23 (<i>Z. mays</i>)	2,2	2,0	0,2	0,1
LoliumRes_a29433_56	Glutathione transferase GST 23 (<i>Z. mays</i>)	2,4	1,7	-0,5	-0,1
LoliumSus_a55538_47	Glutathione transferase GST 23 (<i>Z. mays</i>)	2,2	1,2	-0,2	-0,6
LoliumRes_a24765_79	Heat shock protein 82 (<i>Z. mays</i>)	1,5	0,4	2,5	1,4
LoliumSus_a108847_24	Heat shock protein 90-2 (<i>A. thaliana</i>)	4,5	3,7	exklusiv hoch	exklusiv hoch
LoliumRes_a120_7330	Major allergen Pru ar 1 (<i>P. armeniaca</i>)	0,1	-0,1	2,5	2,1
LoliumRes_a196_2606	Pathogenesis-related protein 1 (<i>A. officinalis</i>)	0,5	-0,1	2,3	1,5
LoliumRes_a15391_110	Pathogenesis-related protein 1 (<i>H. vulgare</i>)	-1,7	1,3	1,2	3,4
LoliumRes_a7210_241	Pathogenesis-related protein 4 (PR-4) (<i>T. monococcum</i>)	0,9	2,2	-1,0	0,0
LoliumRes_a261577_11	Pathogenesis-related protein PRB1-3 (<i>H. vulgare</i>)	exklusiv hoch	exklusiv hoch	exklusiv hoch	exklusiv hoch
LoliumRes_a1305_1278	Pathogen-related protein 10-7 (PR10-7) (<i>L. perenne</i>)	-0,1	-0,1	2,2	1,9
LoliumRes_a133050_21	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP] (<i>A. thaliana</i>)	4,8	3,3	exklusiv hoch	exklusiv hoch

LoliumRes_a508204_6	Putative disease resistance protein RGA3 (<i>S. bulbocastanum</i>)	3,1	3,1	0,1	0,4
LoliumRes_a157432_9	Reticuline oxidase-like protein (<i>A. thaliana</i>)	-0,3	0,5	2,2	2,5
LoliumRes_a189902_15	Ribonucleoprotein At2g37220, chloroplastic (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv hoch	exklusiv hoch	exklusiv hoch	exklusiv hoch
LoliumRes_a70071_29	Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain C (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv hoch	exklusiv hoch	exklusiv hoch	exklusiv hoch
LoliumRes_a15586_126	Thaumatin-like pathogenesis-related protein 1 (<i>A. sativa</i>)	8,7	8,5	6,0	5,2
LoliumSus_a44107_54	Thaumatin-like pathogenesis-related protein 4 (<i>A. sativa</i>)	5,5	7,1	5,3	6,8
LoliumRes_a51325_55	Thaumatin-like pathogenesis-related protein 4 (<i>A. sativa</i>)	3,2	4,0	3,2	4,8
LoliumRes_a2300_676	Wheatwin-2 (<i>T. aestivum</i>)	1,5	2,5	-0,8	0,3
Signalübertragung und Transkription					
LoliumRes_a219355_11	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 7 (<i>A. thaliana</i>)	2,1	1,6	-0,2	-1,7
LoliumRes_a141091_16	Ethylene-responsive transcription factor 1B (<i>A. thaliana</i>)	2,3	0,8	0,9	-0,4
LoliumRes_a36771_51	Ethylene-responsive transcription factor 5 (<i>A. thaliana</i>)	2,1	-0,2	-0,7	-1,7
LoliumSus_a105426_17	Ethylene-responsive transcription factor ERF094 (<i>A. thaliana</i>)	2,1	-0,9	0,4	0,0
LoliumRes_a290854_6	Ethylene-responsive transcription factor ERF094 (<i>A. thaliana</i>)	4,4	1,1	0,8	-0,5
LoliumRes_a37598_68	Glycine-rich RNA-binding protein 7 (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv hoch	exklusiv hoch	exklusiv hoch	exklusiv hoch
LoliumRes_a165853_16	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase SD1-13 (<i>A. thaliana</i>)	4,3	3,9	1,1	0,6
LoliumRes_a605768_5	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2 (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv hoch	exklusiv hoch	0,2	-2,7
LoliumRes_a54681_50	Mitogen-activated protein kinase 1 (<i>O. sativa subsp. japonica</i>)	3,7	3,2	4,9	4,0
LoliumRes_a268348_7	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850 (<i>A. thaliana</i>)	0,9	2,7	-1,1	0,3
LoliumSus_a15330_97	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c (<i>A. thaliana</i>)	0,8	-0,2	2,4	1,4
LoliumRes_a33830_61	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c (<i>A. thaliana</i>)	1,1	-0,1	2,2	1,2
LoliumRes_a21206_41	Probable WRKY transcription factor 51 (<i>A. thaliana</i>)	2,2	-0,4	-0,3	-2,5
LoliumRes_a86354_14	Probably inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At5g48380 (<i>A. thaliana</i>)	2,5	0,1	1,4	-0,1
LoliumSus_a244863_10	Putative serine/threonine-protein kinase-like protein CCR3 (<i>A. thaliana</i>)	-0,9	0,9	0,2	2,3
LoliumRes_a158397_13	RING-H2 finger protein ATL80 (<i>A. thaliana</i>)	-2,7	-1,2	1,2	2,3
LoliumRes_a182687_12	Serine/threonine-protein kinase AtPK2/AtPK19 (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv hoch	exklusiv hoch	exklusiv hoch	exklusiv hoch
LoliumRes_a163297_14	Serine/threonine-protein kinase AtPK2/AtPK19 (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv hoch	exklusiv hoch	exklusiv hoch	exklusiv hoch

LoliumRes_a17307_106	Somatic embryogenesis receptor kinase 1 (<i>A. thaliana</i>)	2,1	1,4	0,0	0,0
LoliumSus_a88994_30	Transcription factor MYB44 (<i>A. thaliana</i>)	-0,8	-0,5	2,0	1,7
LoliumRes_a127239_24	WRKY transcription factor 18 (<i>A. thaliana</i>)	0,1	2,2	-0,6	-0,4
Transport					
LoliumRes_a222452_12	ABC transporter F family member 3 (<i>A. thaliana</i>)	5,1	4,4	4,2	3,7
LoliumRes_a96669_25	Molybdenum cofactor sulfurase (<i>S. lycopersicum</i>)	4,7	3,1	exklusiv hoch	exklusiv hoch
LoliumRes_a608601_4	Putative lipid-transfer protein DIR1 (<i>A. thaliana</i>)	-0,3	-2,1	2,0	-0,6
LoliumSus_a178106_13	Vesicle-associated membrane protein 711 (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv hoch	exklusiv hoch	exklusiv hoch	exklusiv hoch
Lipidmetabolismus					
LoliumRes_a166222_13	Long chain base biosynthesis protein 2a (<i>O. sativa subsp. japonica</i>)	4,8	5,0	exklusiv hoch	exklusiv hoch
LoliumSus_a192371_13	Triacylglycerol lipase 2 (<i>A. thaliana</i>)	2,9	1,7	-0,4	-1,0
Verschiedene					
LoliumRes_a536263_6	NB-ARC domain containing protein (<i>O. sativa subsp. Japonica</i>)	exklusiv hoch	exklusiv hoch	1,0	0,0
LoliumRes_a177001_21	Oryzain beta chain (<i>O. sativa subsp. japonica</i>)	-5,7	exklusiv runter	-0,2	5,8
LoliumSus_a85120_50	Oryzain beta chain (<i>O. sativa subsp. japonica</i>)	-6,7	exklusiv runter	exklusiv hoch	exklusiv hoch
LoliumRes_a47382_19	PTA.236.C1 (<i>L. perenne</i>)	2,9	exklusiv runter	0,3	-1,9
LoliumRes_a166469_10	Putative uncharacterized protein Sb02g040920 (<i>S. bicolor</i>)	-0,3	0,7	5,5	5,4
LoliumSus_a88050_21	Putative uncharacterized protein Sb02g040920 (<i>S. bicolor</i>)	0,1	0,0	exklusiv hoch	exklusiv hoch
LoliumRes_a22756_71	Red chlorophyll catabolite reductase (<i>H. vulgare</i>)	-2,7	2,5	-0,3	0,2
LoliumSus_a156493_19	Ta_Contig77289.ansp (<i>T. aestivum</i>)	1,8	3,3	0,0	-0,1
LoliumRes_a247524_9	Ta_Contig77289.ansp (<i>T. aestivum</i>)	0,9	2,2	-1,7	-0,6
LoliumRes_a320886_5	Tryptophan aminotransferase 1 (<i>A. thaliana</i>)	-3,1	-0,4	1,8	3,3
LoliumRes_a610458_4	Tyrosine N-monooxygenase (<i>S. bicolor</i>)	-3,4	exklusiv runter	2,5	-3,0
LoliumRes_a166688_9	Uncharacterized protein BRADI3G09740 (<i>B. distachyon</i>)	0,9	0,4	3,2	1,2
LoliumSus_a199620_10	Uncharacterized protein BRADI3G19967 (<i>B. distachyon</i>)	1,8	2,3	-0,4	-0,1
LoliumRes_a102746_10	Uncharacterized protein BRADI5G22187 (<i>B. distachyon</i>)	-1,1	0,2	2,7	3,8
LoliumRes_a187787_10	Uncharacterized protein BRADI5G22842 (<i>B. distachyon</i>)	-0,6	-2,4	exklusiv hoch	exklusiv hoch

exklusiv hoch oder runterregulierte Transkripte zeigten keine detektierbare Expression im Vergleichspartner

3.1.2.6 Validierung von Expressionsraten ausgewählter *Lolium perenne*-Transkripte der Schwarzrost-MACE mittels qRT-PCR

Zur Validierung der in der MACE ermittelten Genexpressionsraten wurde der Versuch zeitlich unabhängig wiederholt, RNA isoliert und von acht ausgewählten MACE-Transkripten die Genexpression mittels quantitativer real time-PCR bestimmt. Die getesteten MACE-Transkripte setzten sich aus fünf exklusiv und drei hoch differentiell exprimierten Transkripten, mit signifikant höheren Expressionsraten in den resistenten Bulks zusammen. Der log2FC wurde zwischen den resistenten und anfälligen Bulks berechnet, um einen Vergleich zwischen beiden Methoden zu gewährleisten. Log2FC mit positiven Werten zeigen eine Überexpression in den resistenten Bulks und negative Werte Überexpression der anfälligen Bulks.

Von den 24 Expressionsraten stimmen 16 mit denen in der MACE überein und zeigen eine signifikante Überexpression in den resistenten Bulks in beiden Methoden (Abb. 3.7). Dazu zählen vier homologe Transkripte, die als potentielle Resistenzgene für die Schwarzrostresistenz verantwortlich sein können und „pathogenesis related protein“-Transkripte, die in der Resistenzreaktion involviert sein können. Obwohl die Expressionsraten in der qRT-PCR generell höher sind als in der MACE, bestätigt die qRT-PCR die Überexpression der ausgewählten Transkripte.

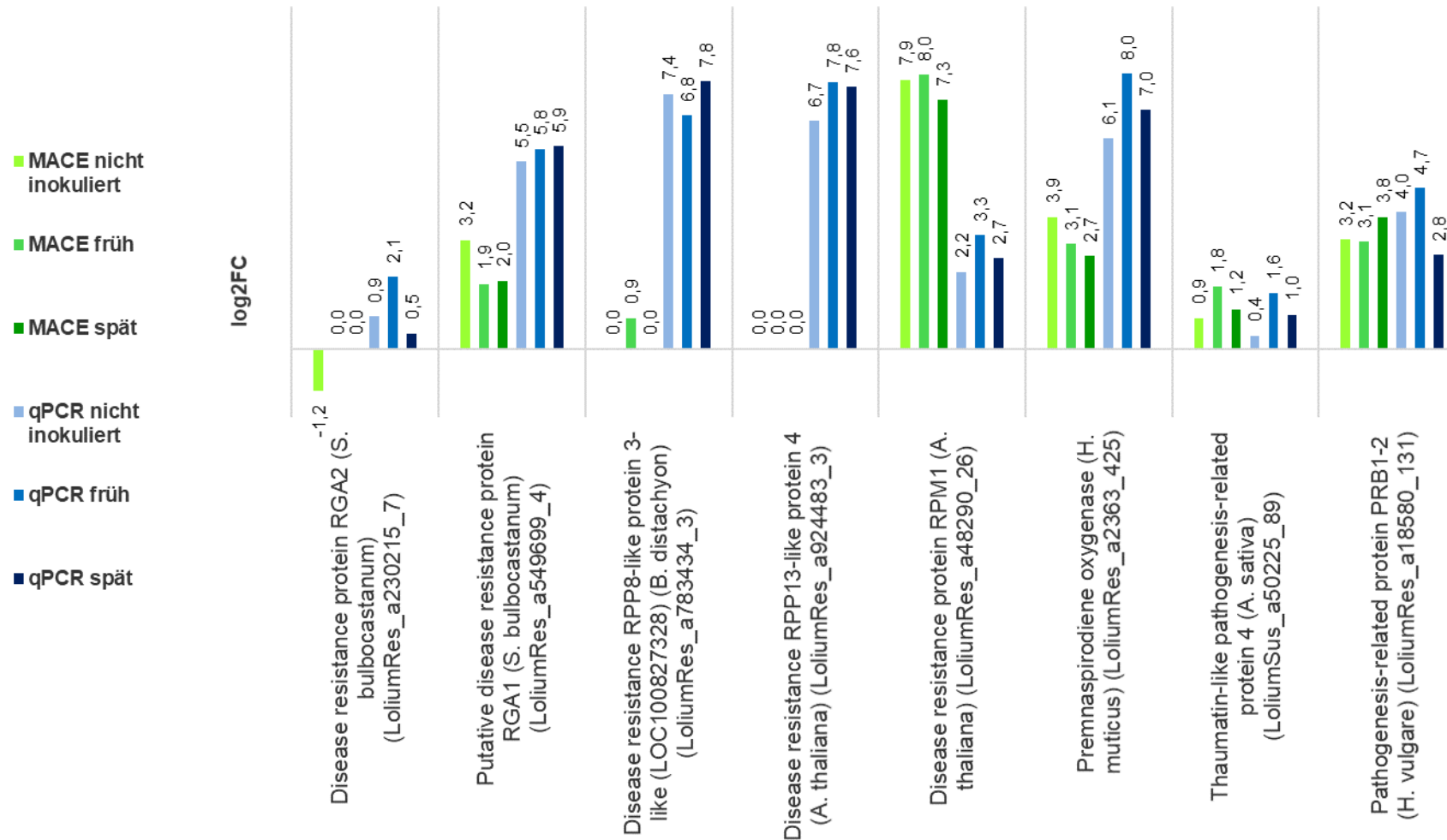


Abb. 3.7 qPCR-Ergebnisse zur Validierung der Schwarzrost-MACE-Expressionsraten an acht überexprimierten *Lolium perenne*-Transkripten in den schwarzrostresistenten im Vergleich zu den -anfälligen Bulks

3.2 Kronenrostresistenz

3.2.1 Phänotypisierung auf Kronenrostresistenz

Die Phänotypisierung der *Lolium*-Population auf Kronenrostresistenz erfolgte mit allen 284 Genotypen der Kartierungspopulation LPSR1001. Die meisten Genotypen zeigten keine Sporulation in den Resistenztests und wurden als vollständig resistent eingestuft. Das Isolat aus Bocksee hatte mit 257 die höchste Anzahl an vollständig resistenten Genotypen (0% befallene Blattfläche) (Abb. 3.8). Im Gegensatz dazu wurde für das Isolat aus Steinach die geringste Anzahl von 151 vollständig resistenten und die höchste Anzahl von 49 hoch anfälligen Genotypen (>40% befallene Blattfläche) bonitiert. Dieses Isolat weist die höchste Virulenz der drei getesteten Kronenrostisolate auf. Für die Isolate aus Rostock und Steinach wurden mehrere Genotypen (49 Rostock, 39 Steinach) mit einer Befallsstärke von >5 bis 10% befallener Blattfläche bonitiert. Diese Genotypen zeigten eine geringere und zeitlich verzögerte Sporulation gegenüber den hochanfälligen Genotypen und wurden als moderat resistent eingestuft (Abb. 3.9). Die Verteilung der Modalwerte zwischen den Kronenrostisolaten zeigte die höchste Korrelation von 0,81 zwischen den Isolaten aus Rostock und Steinach. Das Isolat aus Bocksee zeigte gegenüber den anderen beiden Isolaten die geringste Korrelation von 0,49 mit Rostock und 0,42 mit Steinach. Signifikante Unterschiede zwischen den Kronenrostisolaten wurden nicht festgestellt (Tab 3.9).

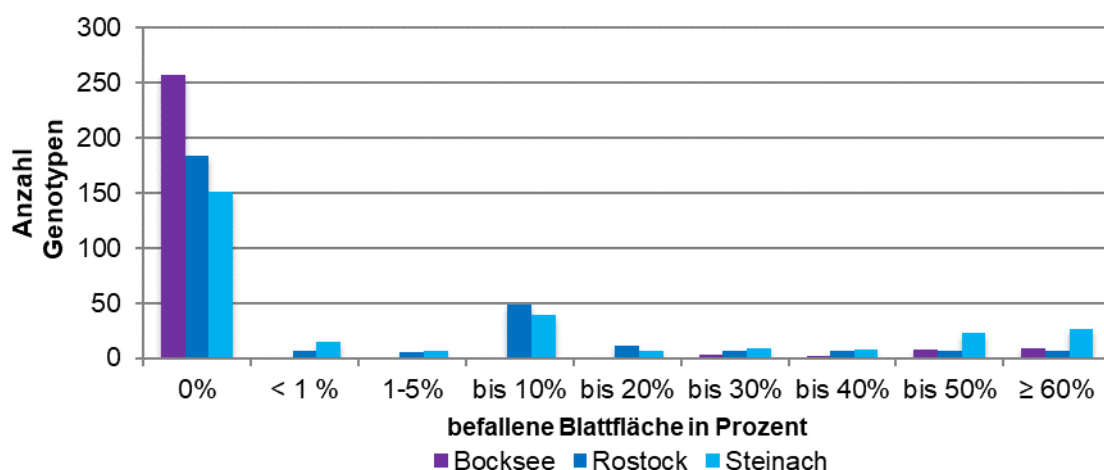
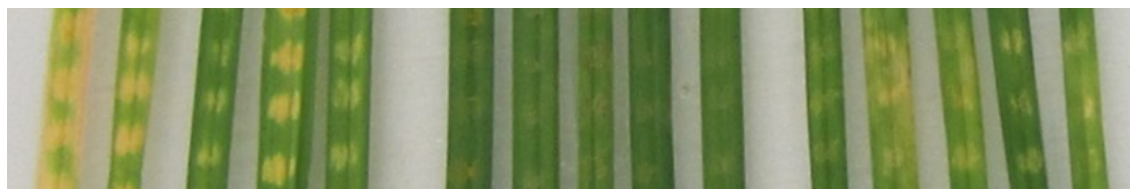


Abb. 3.8 Häufigkeitsverteilung der Boniturmodalwerte von 284 *Lolium perenne*-Genotypen der Kartierungspopulation LPSR1001 inokuliert mit drei Kronenrostfeldisolaten in vierfacher Wiederholung



anfällige Sorte Aurora vollständig resistenter Genotyp moderat resistenter Genotyp

Abb. 3.9 *Lolium perenne*-Genotypen inokuliert mit dem Kronenrosteinsporisolat KR-SR1 7 Tage nach Inokulation

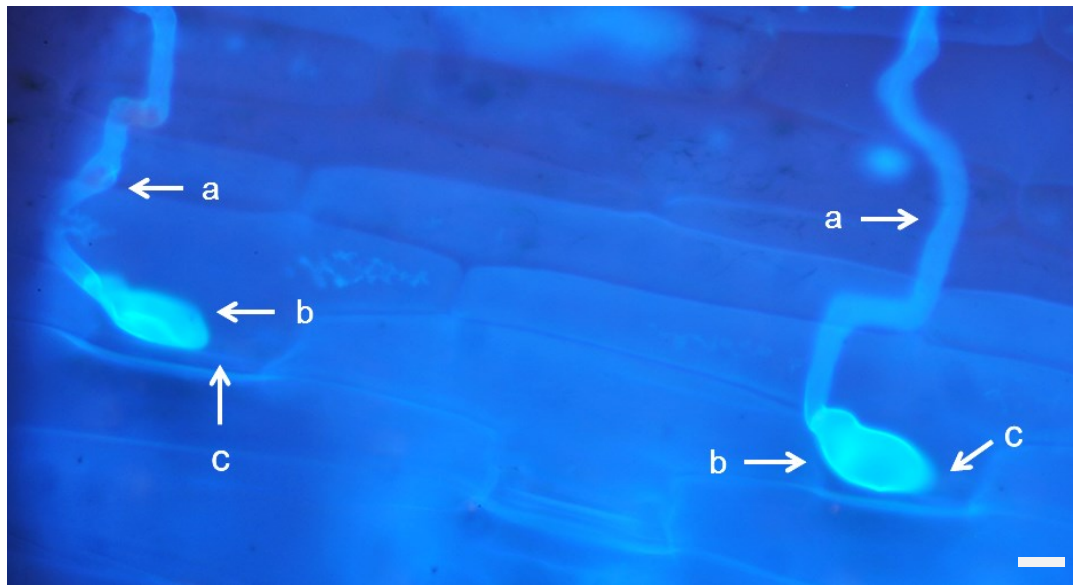
3.2.2 Histologische Charakterisierung der kronenrostresistenten *Lolium perenne*-Genotypen

Um zu überprüfen, in welchem Stadium der Rostentwicklung die Resistenzreaktionen in den Genotypen wirksam werden, wurde repräsentativ für jeden Resistenztyp ein Genotyp ausgewählt. Die Resistenztypen setzten sich aus einem vollständig resistenten (LPSR1001/102, VRG), moderat resistenten (LPSR1001/7, MRG) und anfälligen Genotyp (LPSR1001/255, AG) sowie dem resistenten Elter (LPSR2061 1/1, RE) und die als Kontrolle fungierende hochanfällige Sorte Aurora, zusammen. An Hand von vergleichender fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen ließen sich quantitative Unterschiede in der Ausbildung von Infektionsstrukturen zwischen den Genotypen nachweisen. Um die Rostentwicklung zwischen den Genotypen vergleichbar zu halten, wurde die relative Häufigkeit der betrachteten Infektionsstruktur bezogen auf die jeweils vorausgehende Struktur prozentual berechnet, d. h., wenn von 50 gezählten Appressorien insgesamt 40 substomatäre Vesikel ausgehen, ist die substomatäre Vesikelbildung 80%.

3.2.2.1 Einfluss der kronenrostresistenten *Lolium perenne*-Genotypen auf die Keimfähigkeit und Appressorienbildung des Kronenrosteinsporisolats KR-SR1

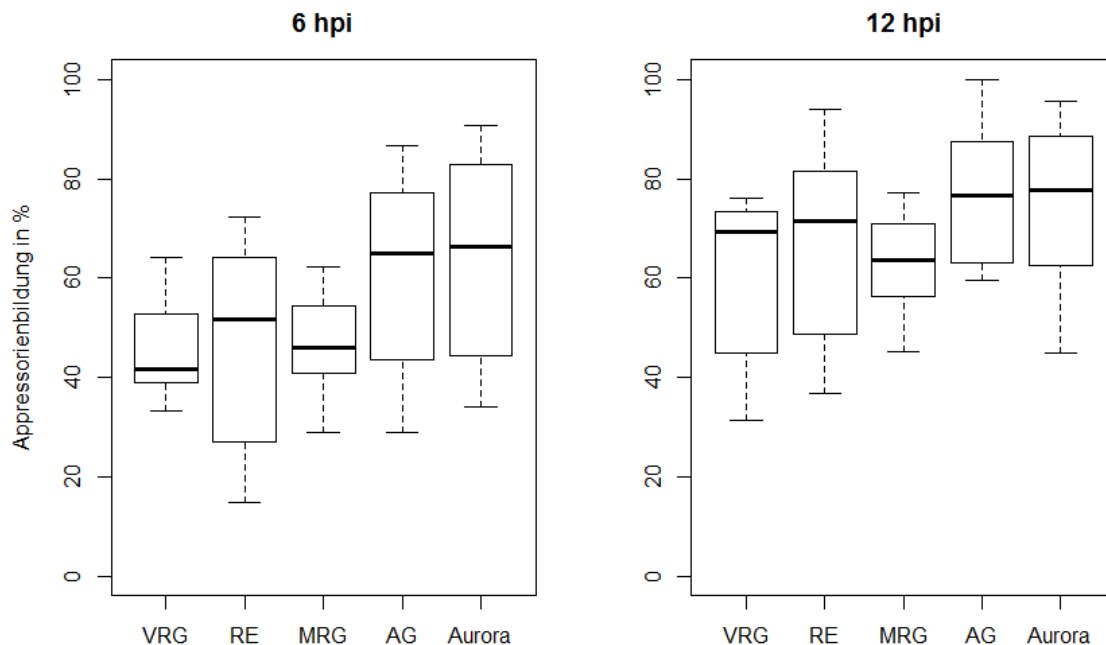
Die Inokulation der adaxialen Blattseite mit dem Einsporisolat KR-SR1 führte auf allen Genotypen zur erfolgreichen Uredosporenkeimung, Lokalisation und Penetration der Stomata (Abb. 3.10) sowie der Ausbildung substomatärer Vesikel im Interzellullarraum 12 hpi durch KR-SR1. Nach der Inokulation wurde die Uredosporenkeimung und Appressorienbildung auf den Blattstücken 6 und 12 hpi dokumentiert. Diese stieg 6 hpi von 83,4 % auf dem VRG bzw. 67,8 % auf dem RE auf 87,0 % bzw. 74,6 % und erreichte ihr Maximum 12 hpi.

Sechs hpi bildeten 46 % der gekeimten Uredosporen auf den Resistenztypen VRG, MRG und RE ein Appressorium (APP), dagegen waren es auf dem AG und Aurora 62 %. Nach weiteren 6 Stunden (12 hpi) stieg der Anteil gebildeter APP auf 63 % auf dem VRG, MRG und RE bzw. 76 % auf dem AG und Aurora. Auf den resistenten Genotypen (VRG, RE und MRG) wurden 6 und 12 hpi eine um ca. 10 % signifikant geringere APP Bildung im Vergleich zu den anfälligen Genotypen festgestellt (Abb. 3.11, siehe Anhang A2).



(a = Keimschlauch; b = Appressorium; c = Stoma; Balken: 10 μ m)

Abb. 3.10 Keimschläuche und Appressorien von *Puccinia coronata* auf der adaxialen Blattoberfläche des kronenrostanfälligen Genotyps angefärbt mit Fluorescent Brightener 28



VRG = vollständig resistenter Genotyp, RE = resistenter Elter, MRG = moderat resistenter Genotyp, AG = anfälliger Genotyp, Aurora = hochanfällige Sorte

Abb. 3.11 Prozentualer Anteil gebildeter *Puccinia coronata*-Appressorien auf ausgewählten *Lolium perenne*-Genotypen 6 und 12 Stunden nach Inokulation

3.2.2.2 Einfluss der kronenrostresistenten *Lolium perenne*-Genotypen auf die Bildung substomatärer Vesikel und Infektionshyphen des Kronenrosteinsporisolats KR-SR1

Auf die Bildung der APP folgten die Penetration der Stomata und die Entwicklung der substomatären Vesikel (SSV) im Interzellularraum der Wirtspflanze. Das Verhältnis von SSV zu APP kann demzufolge als Penetrationserfolg betrachtet werden. Erste SSV wurden 6 hpi beobachtet. 12 hpi wurden signifikant weniger SSV im VRG gezählt, als in allen anderen Genotypen. Die Entwicklung dieser erreichte 24 hpi ihr Maximum von 75,2 – 94,4 % (Abb. 4.5). Auf Grund dessen wurden alle späteren Zeitpunkte, einschließlich 24 hpi, für die Berechnung von Unterschieden zwischen den Genotypen zusammengefasst, da diese als Wiederholung angesehen werden können. Die Genotypen der Kartierungspopulation weisen eine signifikant geringere SSV Bildung im Vergleich zu Aurora auf. Der VRG zeigt mit 69,8 %, bezogen auf den Zeitraum 24-60 hpi, von allen Genotypen die signifikant geringste SSV Bildung, gefolgt vom MRG mit 82,7 % und dem AG bzw. RE mit 86,9 bzw. 88,3 %. Die Unterschiede zwischen den Genotypen in der SSV-Entwicklung setzen sich in der Infektionshyphen-Bildung (IH) nicht fort. Eine signifikant geringere IH-Bildung

24 hpi wurde bei dem VRG und MRG beobachtet. Dieser Unterschied beschränkte sich ausschließlich auf diese Zeitpunkte und konnte in den nachfolgenden Zeitpunkten nicht nachgewiesen werden.

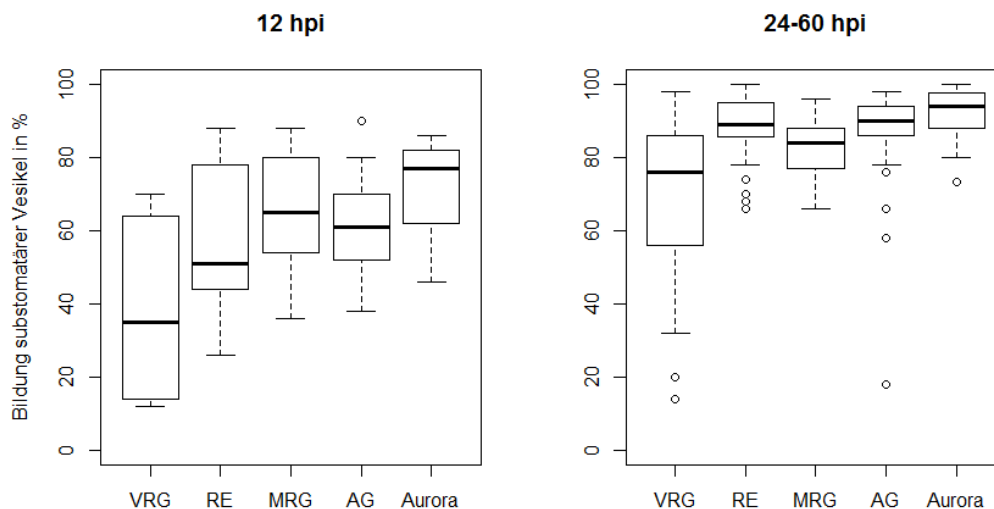


Abb. 3.12 Prozentualer Anteil gebildeter substomatärer Vesikel von *Puccinia coronata* auf ausgewählten *Lolium perenne*-Genotypen 12 und 24 – 60 Stunden nach Inokulation

3.2.2.3 Einfluss der kronenrostresistenten *Lolium perenne*-Genotypen auf die Haustorienmutterzellen Entwicklung des Kronenrost-einsporisols KR-SR1

Nach erfolgreicher Entwicklung von IH wurde die Ausbildung von Haustorienmutterzellen (HMZ) zum Zeitpunkt 24 hpi nach Kontakt mit Mesophyllzellen des Wirtes beobachtet. Für die Resistenztypen VRG, MRG und RE erscheint dieser Kontakt als Auslöser für die spezifischen Resistenzreaktionen. Die ersten signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen wurden 24 hpi festgestellt (siehe Anhang A2).

Bis 36 hpi steigt die HMZ-Anzahl im VRG und RE an und stagniert ab diesem Zeitpunkt bei 1,9 - 2,2 bzw. 2,3 - 2,5 (Abb. 3.13). 60 hpi wurde in beiden Genotypen eine gelbe bis orangefarbene Autofluoreszenz der mit den HMZ in Kontakt getretenen Mesophyllzellen beobachtet (Abb. 3.14). Bei der Phänotypisierung wurde auf Blattsegmenten dieser Genotypen zu keinem Zeitpunkt eine Sporulation festgestellt. Trotz dieser Gemeinsamkeiten ist der Kronenrost in der Lage im RE signifikant mehr HMZ zu bilden, als im VRG.

24 hpi wurde im VRG, MRG und AG eine signifikant geringere HMZ-Bildung im Vergleich zu Aurora dokumentiert. Dieser Trend setzte sich 36, 48 und 60 hpi im MRG fort, so dass 60 hpi im AG und Aurora mehr als doppelt so viele HMZ gezählt wurden, als im MRG (Abb. 3.13, Anhang A2). Im AG und Aurora ist 48 und 60 hpi die HMZ Bildung von KR-SR1 identisch, beide Genotypen zeigten ab 48 hpi eine signifikant erhöhte Zunahme der HMZ im Vergleich zu den Resistenztypen. Eine stagnierende Rostentwicklung oder Eigenfluoreszenz war im MRG nicht zu beobachten, dafür eine um 2 – 4 Tage zeitlich verzögerte Sporulation verglichen mit dem AG und Aurora (Abb. 3.9).

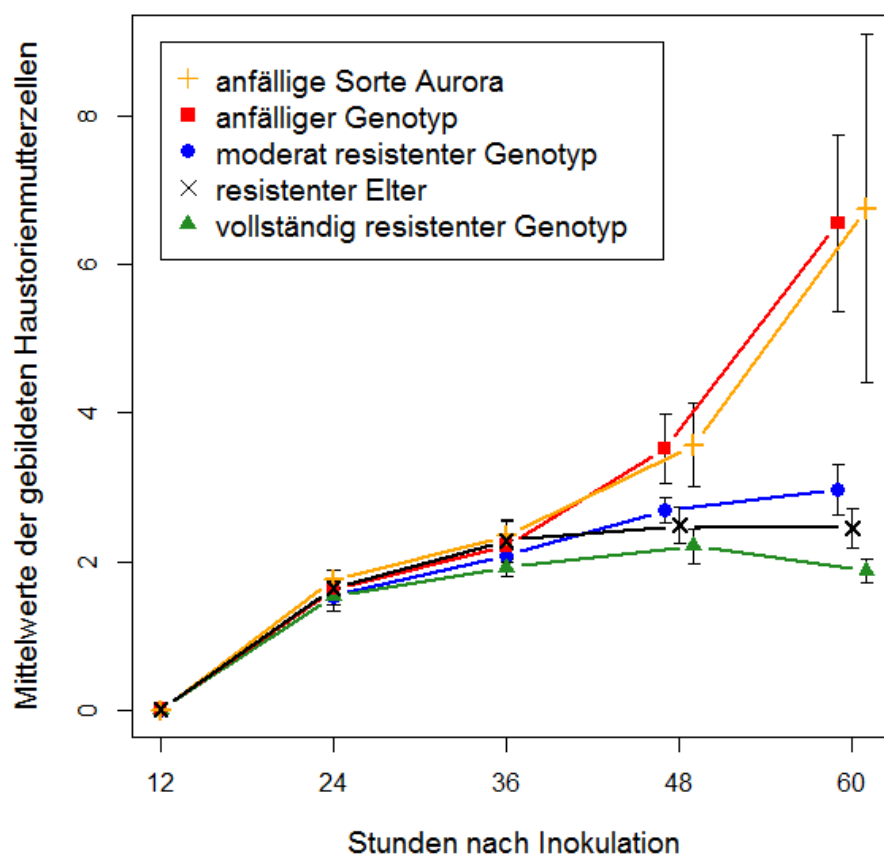
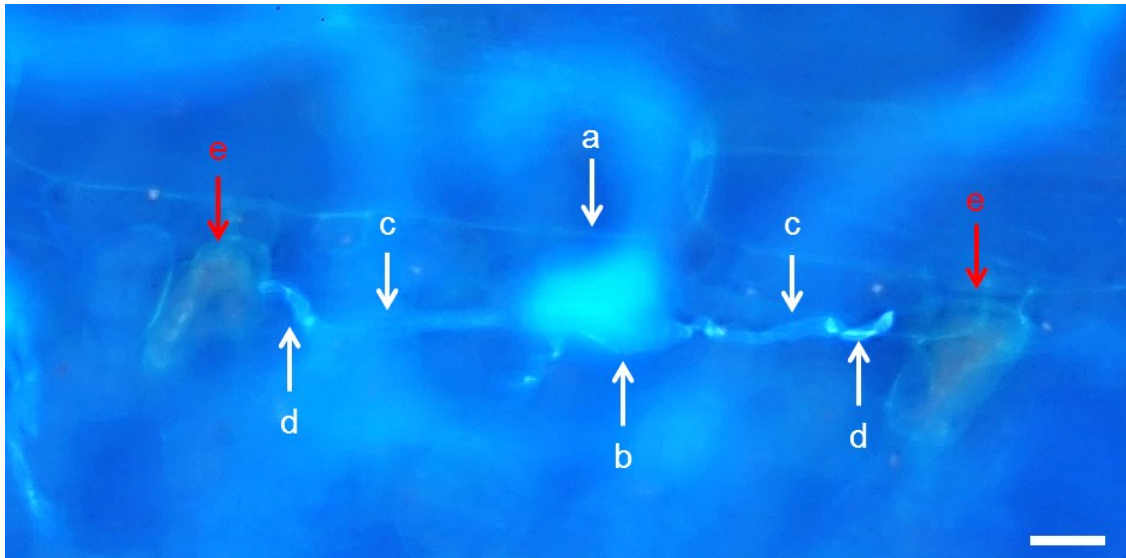


Abb. 3.13 Zeitlicher Verlauf der Haustorienmutterzellen-Bildung von *Puccinia coronata* in ausgewählten *Lolium perenne*-Genotypen 12 bis 60 Stunden nach Inokulation

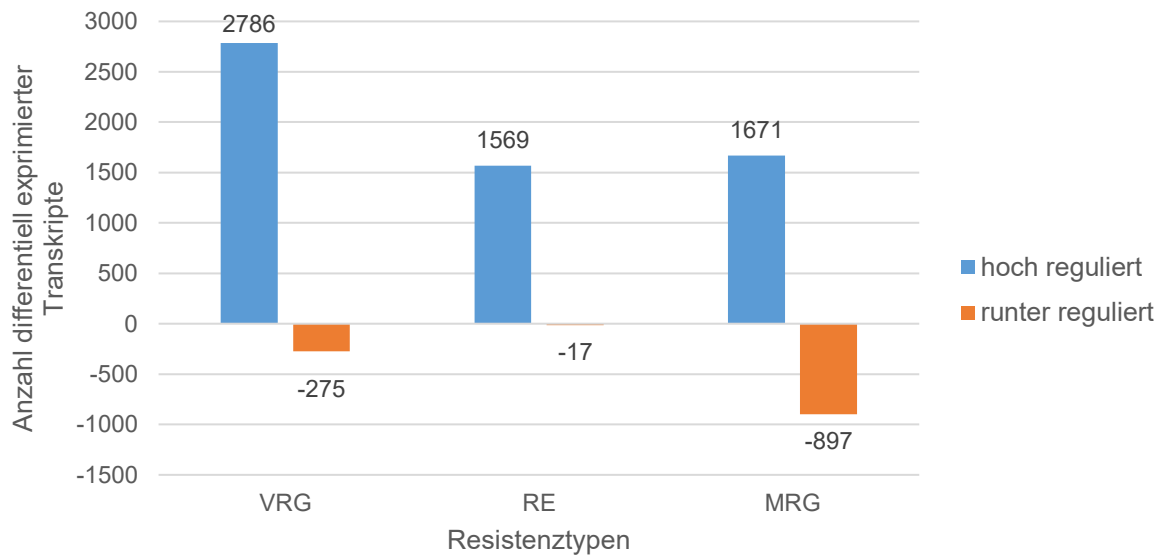


(a = Appressorium, b = substomatäres Vesikel, c = Infektionshypha, d = Haustorienmutterzelle, e = Autofluoreszenz; Balken: 10 µm)

Abb. 3.14 Infektionsstrukturen und Autofluoreszenz der Mesophyllzellen nach Kontakt mit Haustorienmutterzellen im vollständig resistenten *Lolium perenne*-Genotyp 60 Stunden nach Inokulation angefärbt mit Fluorescent Brightener 28

3.2.3 Kronenrost-MACE

Um Unterschiede in den Genexpressionsprofilen zwischen den Genotypen festzustellen und resistenzassoziierte Transkripte zu selektieren, wurde die Genexpression der Resistenztypen VRG, MRG und RE mit der des AG verglichen. Die Anzahl der differentiell exprimierten Transkripte im VRG ist im Vergleich zum AG mit 2786 überexprimierten Transkripten deutlich höher als die Anzahl überexprimierter Transkripte im RE und MRG mit 1569 bzw. 1671 (Abb. 3.15). Demgegenüber ist die Anzahl von 897 runterregulierten Transkripten im MRG im Vergleich zum VRG und RE am höchsten.



(log2FC ≥ 2 ; ≤ -2 ; $p < 0.001$; FDR < 0.001)

Abb. 3.15 Anzahl signifikant differentiell exprimierter Transkripte ausgewählter kronenrostresistenter *Lolium perenne*-Genotypen im Vergleich zum -anfälligen Genotyp

3.2.3.1 „Gene Ontology“ mit überexprimierten Transkripten in den kronenrostresistenten *Lolium perenne*-Genotypen

Als erstes wurde mit Hilfe der „Gene Ontology“ (GO)-Analyse für jeden Resistenztyp ein globales Genexpressionsprofil erstellt und die GO „biological process“ auf signifikant differentiell exprimierte Transkripte mit Zuordnung zur pflanzlichen Abwehr selektiert. Die Charakterisierung der spezifischen Resistenztypen erfolgte anschließend an Hand der zu diesen GOs zugeordneten hoch differentiell exprimierten Transkripten. Die Vergleiche der Resistenztypen mit dem AG zeigen Resistenz-spezifische Genexpressionsprofile der einzelnen Genotypen und die für jede Resistenz überexprimierten biologischen Prozesse auf. Im VRG wurden 52, im RE 50 und im MRG 15 GOs gegenüber dem AG mit signifikant überexprimierten Transkripten identifiziert ($\log_2\text{FC} \geq 2$; $p < 0,05$) (siehe Anhang A3). GOs, die von allen resistenten Genotypen, von zwei Genotypen bzw. spezifisch für einen Genotyp sind, wurden in Tabelle 3.5 dargestellt. In allen drei Resistenztypen finden sich zwei GOs mit exklusiv überexprimierten Transkripten, d.h. diese wurden ausschließlich in den Resistenztypen exprimiert. Beide GOs beinhalten Transkripte, die an der Regulation der Superoxiddismutaseaktivität beteiligt sind. Der VRG und RE zeigen GOs, die an der hypersensitiven Reaktion und dem programmierten Zelltod beteiligt sind, was

den Beobachtungen in der histologischen Charakterisierung entspricht. Weitere Gemeinsamkeiten in der Genexpression zeigen der VRG und der MRG. In beiden Genotypen werden Transkripte überexprimiert, die an der Tryptophan- und Indolalkylaminbiosynthese sowie am Zellwandabbau bzw -umbau beteiligt sind. Der RE und MRG zeigen keine Gemeinsamkeiten hinsichtlich der GOs auf.

Spezifisch für den jeweiligen Resistenztyp wurden im VRG 37, im RE 40 und im MRG 8 GOs mit signifikant überexprimierten Transkripten im Vergleich zum AG identifiziert. Von diesen sind: im VRG sechs der Wirt/Parasit-Interaktion, drei dem hypersensitiven Zelltod, zwei an der Synthese von Salicylsäure, drei der unspezifischen Immunreaktion und acht der Bildung von Tryptophan, aromatischen Aminosäuren und Glykosiden sowie cyanogenen Glykosiden zugeordnet. Von den GOs mit Annotation zur Wirt/Parasit-Interaktion wurden vier exklusiv im VRG identifiziert. Diesen GOs sind ausschließlich Transkripte mit Homologie zu viralen Proteingenen zugeordnet.

Im RE sind 13 GOs mit überexprimierten Transkripten identifiziert worden, die am Umbau und Transport von Aminen bzw. Aminosäuren beteiligt sind. Davon wurden in 11 GOs Transkripte exklusiv nur im RE exprimiert. Des Weiteren wurden drei GOs mit überexprimierten Transkripten ermittelt, die an der Reaktion gegenüber einem externen Stimulus und zwei GOs, die an der Zellwandverstärkung und der damit verbundenen Calloseablagerung beteiligt sind.

Der MRG zeigte überexprimierte Transkripte in vier GOs, die an der Polyprenolbiosynthese, an Prozessen der Inosinbildung und an der negativen Regulation des Cytokinin-Signalwegs beteiligt sind.

Tab. 3.5 „Gene Ontology“ signifikant überexprimierter Transkripte in den *Puccinia coronata*-resistenten *Lolium perenne*-Genotypen im Vergleich zum anfälligen Genotyp 0 – 24 Stunden nach Inokulation

Gene Ontology- Identifikation	Gene Ontology- Beschreibung	Log2FC		
		vollständig resistent	resistenter Elter	moderat resistent
GO:1901668	regulation of superoxide dismutase activity	exklusiv	exklusiv	exklusiv
GO:1901671	positive regulation of superoxide dismutase activity	exklusiv	exklusiv	exklusiv
GO:0006995	cellular response to nitrogen starvation	3,3	exklusiv	
GO:0009626	plant-type hypersensitive response	2,3	2,8	
GO:0034050	host programmed cell death induced by symbiont	2,3	2,8	
GO:0043562	cellular response to nitrogen levels	2,3	exklusiv	
GO:1901804	beta-glucoside metabolic process	2,3	exklusiv	
GO:1901806	beta-glucoside biosynthetic process	2,3	exklusiv	
GO:0010132	dhurrin biosynthetic process	2,3	exklusiv	
GO:0012501	programmed cell death	2,1	2,8	
GO:0042435	indole-containing compound biosynthetic process	2,9		2,0
GO:0000162	tryptophan biosynthetic process	2,3		2,2
GO:0046219	indolalkylamine biosynthetic process	2,3		2,2
GO:0009830	cell wall modification involved in abscission	2,0		2,0
GO:0044277	cell wall disassembly	2,0		2,0
GO:0044000	movement in host	exklusiv		
GO:0046739	spread of virus in multicellular host	exklusiv		
GO:0046740	spread of virus in host, cell to cell	exklusiv		
GO:0048832	specification of organ number	exklusiv		
GO:0048833	specification of floral organ number	exklusiv		
GO:0051814	movement in other organism involved in symbiotic interaction	exklusiv		
GO:0080009	mRNA methylation	exklusiv		
GO:0097167	circadian regulation of translation	exklusiv		
GO:0010363	regulation of plant-type hypersensitive response	3,6		
GO:0042430	indole-containing compound metabolic process	3,0		
GO:0045088	regulation of innate immune response	2,8		
GO:0009696	salicylic acid metabolic process	2,7		
GO:0009697	salicylic acid biosynthetic process	2,7		
GO:0002682	regulation of immune system process	2,7		

GO:0006568	tryptophan metabolic process	2,6	
GO:0006586	indolalkylamine metabolic process	2,6	
GO:0006612	protein targeting to membrane	2,4	
GO:0072657	protein localization to membrane	2,4	
GO:0090150	establishment of protein localization to membrane	2,4	
GO:0008037	cell recognition	2,4	
GO:0048544	recognition of pollen	2,4	
GO:0009073	aromatic amino acid family biosynthetic process	2,3	
GO:0016137	glycoside metabolic process	2,3	
GO:0016138	glycoside biosynthetic process	2,3	
GO:0019756	cyanogenic glycoside biosynthetic process	2,3	
GO:0042341	cyanogenic glycoside metabolic process	2,3	
GO:0042991	transcription factor import into nucleus	2,3	
GO:0050898	nitrile metabolic process	2,3	
GO:0080028	nitrile biosynthetic process	2,3	
GO:1901642	nucleoside transmembrane transport	2,3	
GO:1902358	sulfate transmembrane transport	2,3	
GO:0009875	pollen-pistil interaction	2,2	
GO:0009627	systemic acquired resistance	2,2	
GO:0008219	cell death	2,1	
GO:0016265	death	2,1	
GO:0052126	movement in host environment	2,0	
GO:0052192	movement in environment of other organism involved in symbiotic interaction	2,0	
GO:0000209	protein polyubiquitination		exklusiv
GO:0000255	allantoin metabolic process		exklusiv
GO:0000256	allantoin catabolic process		exklusiv
GO:0009410	response to xenobiotic stimulus		exklusiv
GO:0010135	ureide metabolic process		exklusiv
GO:0010136	ureide catabolic process		exklusiv
GO:0010163	high-affinity potassium ion import		exklusiv
GO:0010440	stomatal lineage progression		exklusiv
GO:0010769	regulation of cell morphogenesis involved in differentiation		exklusiv
GO:0015837	amine transport		exklusiv
GO:0032890	regulation of organic acid transport		exklusiv
GO:0032973	amino acid export		exklusiv
GO:0043157	response to cation stress		exklusiv

GO:0043266	regulation of potassium ion transport		exklusiv	
GO:0043270	positive regulation of ion transport		exklusiv	
GO:0044210	'de novo' CTP biosynthetic process		exklusiv	
GO:0051353	positive regulation of oxidoreductase activity		exklusiv	
GO:0051952	regulation of amine transport		exklusiv	
GO:0051955	regulation of amino acid transport		exklusiv	
GO:0060284	regulation of cell development		exklusiv	
GO:0080027	response to herbivore		exklusiv	
GO:0080092	regulation of pollen tube growth		exklusiv	
GO:0080143	regulation of amino acid export		exklusiv	
GO:0009267	cellular response to starvation		4,0	
GO:0031669	cellular response to nutrient levels		4,0	
GO:0042594	response to starvation		4,0	
GO:0045454	cell redox homeostasis		4,0	
GO:0009991	response to extracellular stimulus		3,3	
GO:0031668	cellular response to extracellular stimulus		3,3	
GO:0071496	cellular response to external stimulus		3,3	
GO:0052386	cell wall thickening		2,6	
GO:0052543	callose deposition in cell wall		2,6	
GO:0006260	DNA replication		2,4	
GO:0015074	DNA integration		2,3	
GO:0090305	nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis		2,3	
GO:0006259	DNA metabolic process		2,2	
GO:0006278	RNA-dependent DNA replication		2,2	
GO:0006508	proteolysis		2,0	
GO:0031407	oxylipin metabolic process		2,0	
GO:0031408	oxylipin biosynthetic process		2,0	
GO:0019408	dolichol biosynthetic process			exklusiv
GO:0019348	dolichol metabolic process			exklusiv
GO:0033386	geranylgeranyl diphosphate biosynthetic process			exklusiv
GO:0006148	inosine catabolic process			exklusiv
GO:0046102	inosine metabolic process			exklusiv
GO:0080037	negative regulation of cytokinin mediated signaling pathway			exklusiv
GO:0016094	polyprenol biosynthetic process			exklusiv
GO:0016093	polyprenol metabolic process			exklusiv

exklusiv = ohne nachweisbare Expression im anfälligen Genotyp

3.2.3.2 Differenziell exprimierte Gene zwischen den kronenrostresistenten *Lolium perenne*-Genotypen nach Inokulation mit dem

Kronenrosteinsporisolat mit Zuordnung zur pflanzlichen Abwehr

Basierend auf der Zuordnung der exprimierten Transkripte zu den bereits beschriebenen GOs wurde zusätzlich die GO „defense response“ in die Auswertung aufgenommen. In dieser GO werden Transkripte zusammengefasst, die als Reaktion auf einen Fremdorganismus oder eine Verwundung exprimiert werden und zu einer Wachstumsrestriktion des Fremdorganismus oder zu einer Prävention/Erholung von einer Infektion führen. Die den signifikant überexprimierten GOs zugeordneten Transkripte ($\log_2 Fc \geq 2$; $p \leq 0,01$; $FDR \geq 0,001$) sind nach ihrem Vorkommen in den Resistenztypen in Tabelle 3.6 dargestellt. Insgesamt wurden 68 Transkripte signifikant überexprimiert. Davon wurden 12 in allen Resistenztypen, 12 im VRG und RE und 20 im VRG und MRG überexprimiert. Zwischen dem RE und MRG wurden keine Transkripte mit Zuordnung zur Pflanzenabwehr gemeinsam überexprimiert. Insgesamt weisen die überexprimierten Transkripte Homologie zu Resistenzgenen, Transkriptionsfaktoren, Proteinkinasen, Rezeptoren, Transportern und antifungalen Proteinen auf. Diese Proteine umfassen eine große Bandbreite von resistenzspezifischen Funktionen, von der Pathogenerkennung bis zur erfolgreichen Abwehr.

Tab. 3.6 Signifikant überexprimierte Transkripte in den *Puccinia coronata*-resistenten *Lolium perenne*-Genotypen im Vergleich zum anfälligen Genotyp 0 – 24 Stunden nach Inokulation

Gen-Identifikation	Gen-Beschreibung	log2FC		
		VRG	RE	MRG
LoliumRes_a162018_11	Putative disease resistance protein Sb02g040920 (<i>S. bicolor</i>)	exklusiv	exklusiv	exklusiv
LoliumRes_a187703_15	Putative disease resistance RPP13-like protein 3 (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv	exklusiv	exklusiv
LoliumSus_a199938_14	Dynamin-related protein 1E (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv	exklusiv	exklusiv
LoliumSus_a45910_22	Disease resistance protein RPP13 (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv	exklusiv	exklusiv
LoliumRes_a55220_24	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 15a (<i>A. thaliana</i>)	8,3	6,8	7,3
LoliumRes_a18580_131	Pathogenesis-related protein PRB1-2 (<i>H. vulgare</i>)	7,3	5,4	5,9
LoliumRes_a32737_43	Probable disease resistance RPP8-like protein 2 (<i>A. thaliana</i>)	6,4	5,3	5,7

LoliumRes_a850 51_27	Predicted protein (<i>H. vulgare</i> var. <i>distichum</i>)	6,4	5,1	5,4
LoliumRes_a166 216_12	Disease resistance protein RPM1 (<i>A. thaliana</i>)	4,9	4,6	4,5
LoliumSus_a852 19_18	Putative disease resistance RPP13-like protein 3 (<i>A. thaliana</i>)	4,3	4,5	5,0
LoliumRes_a438 69_30	Ethylene-responsive transcription factor 11 (<i>A. thaliana</i>)	4,2	4,2	3,8
LoliumRes_a961 12_26	Predicted protein (<i>H. vulgare</i> var. <i>distichum</i>)	3,7	3,6	4,7
LoliumRes_a636 329_5	Receptor-like protein kinase 5 (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv	exklusiv	0
LoliumRes_a319 973_6	Disease resistance protein RPM1 (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv	exklusiv	0
LoliumRes_a917 47_18	Disease resistance RPP8-like protein 3-like (BRADI1G34430) (<i>B. distachyon</i>)	8,5	8,5	0
LoliumRes_a338 30_61	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c (<i>A. thaliana</i>)	8,3	7,9	0
LoliumRes_a320 92_126	Polyol transporter 5 (<i>A. thaliana</i>)	6,9	6,1	0
LoliumSus_a595 35_65	<i>Lolium perenne</i> subsp. <i>perenne</i> PTA.236.C1 mRNA sequence	5,8	6,2	0
LoliumRes_a482 90_26	Disease resistance protein RPM1 (<i>A. thaliana</i>)	5,8	5,8	0
LoliumRes_a329 623_5	Disease resistance protein RPM1-like (BRADI4G09587) (<i>B. distachyon</i>) -	5,5	5,8	0
LoliumRes_a473 82_19	<i>Lolium perenne</i> subsp. <i>perenne</i> PTA.236.C1 mRNA sequence	5,4	6,1	0
LoliumRes_a378 59_64	Transcription factor TGA4 (<i>A. thaliana</i>)	4,5	4,4	0
LoliumRes_a250 59_69	Vacuolar-sorting receptor 6 (<i>A. thaliana</i>)	4,3	6,2	0
LoliumRes_a558 25_27	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (<i>A. thaliana</i>)	3,9	3,5	0
LoliumRes_a228 570_6	Disease resistance RPP8-like protein 3 (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv	0	exklusiv
LoliumSus_a179 922_11	Disease resistance protein RGA2 (<i>S. bulbocastanum</i>)	exklusiv	0	exklusiv
LoliumRes_a219 869_13	Receptor-like protein kinase 5 (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv	0	exklusiv
LoliumSus_a187 22_112	Membrane steroid-binding protein 2 (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv	0	exklusiv
LoliumSus_a238 782_9	Putative disease resistance protein (Sb02g040920) (<i>S. bicolor</i>)	exklusiv	0	exklusiv
LoliumRes_a485 94_16	Disease resistance protein RPM1 (<i>A. thaliana</i>)	7,1	0	7,3
LoliumRes_a521 6_338	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 13 (<i>A. thaliana</i>)	6,8	0	6,8
LoliumRes_a535 88_25	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (<i>A. thaliana</i>)	6,8	0	6,8
LoliumRes_a531 00_32	Probable serine/threonine-protein kinase At5g41260 / brassinosteroid-signaling kinase 8 (<i>A. thaliana</i>)	6,7	0	6,5
LoliumSus_a499 2_372	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 13 (<i>A. thaliana</i>)	6,6	0	6,6

LoliumRes_a153 42_155	<i>Lolium perenne</i> subsp. <i>perenne</i> PTA.2441.C1 mRNA sequence	6,6	0	6,7
LoliumRes_a106 700_16	Putative late blight resistance protein homolog R1C-3 (<i>S. demissum</i>)	6,0	0	5,8
LoliumRes_a984 45_14	LRR receptor-like serine/threonine- protein kinase EFR (<i>A. thaliana</i>)	5,7	0	6,2
LoliumRes_a177 265_9	Disease resistance protein RGA2 (<i>S.</i> <i>bulbocastanum</i>)	5,4	0	5,8
LoliumRes_a229 587_8	Putative disease resistance protein At4g19050 (<i>A. thaliana</i>)	5,4	0	4,6
LoliumRes_a144 624_17	Shikimate O- hydroxycinnamoyltransferase (<i>A.</i> <i>thaliana</i>)	5,1	0	4,0
LoliumRes_a219 355_11	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 7 (<i>A. thaliana</i>)	4,3	0	6,2
LoliumRes_a972 6_93	Putative disease resistance RPP13-like protein 3 (<i>A. thaliana</i>)	4,0	0	4,2
LoliumRes_a617 17_25	Probable receptor-like protein kinase At5g47070 (<i>A. thaliana</i>)	4,0	0	3,4
LoliumRes_a118 09_59	5'-3' exoribonuclease 4 (<i>A. thaliana</i>)	3,9	0	3,5
LoliumRes_a272 877_6	Putative disease resistance RPP13-like protein 3 (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv	0	0
LoliumRes_a314 476_6	Putative disease resistance protein At1g63350 (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv	0	0
LoliumRes_a536 263_6	NB-ARC domain containing protein LOC_Os12g06920 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)	exklusiv	0	0
LoliumRes_a684 889_4	Wall-associated receptor kinase 1 (<i>A.</i> <i>thaliana</i>)	8,0	0	0
LoliumSus_a273 203_6	Putative uncharacterized protein OsI_37604 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>Indica</i>)	5,8	0	0
LoliumRes_a259 696_8	Putative uncharacterized protein Sb06g000340 (<i>S. bicolor</i>)	5,7	0	0
LoliumSus_a345 62_72	Probable glucan endo-1,3-beta- glucosidase A6 (<i>A. thaliana</i>)	4,3	0	0
LoliumSus_a156 214_15	Defensin-like protein (<i>P. integrifolia</i>)	4,3	0	0
LoliumRes_a394 67_47	Probable glucan endo-1,3-beta- glucosidase A6 (<i>A. thaliana</i>)	4,3	0	0
LoliumRes_a136 003_20	Defensin-like protein (<i>P. integrifolia</i>)	3,9	0	0
LoliumSus_a334 38_36	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (<i>A. thaliana</i>)	3,0	0	0
LoliumRes_a117 549_14	Disease resistance protein RGA2 (<i>S.</i> <i>bulbocastanum</i>)	0	exklusiv	0
LoliumRes_a459 382_5	Protein NSP-INTERACTING KINASE 2 (<i>A. thaliana</i>)	0	exklusiv	0
LoliumSus_a880 50_21	Putative uncharacterized protein Sb02g040920 (<i>S. bicolor</i>)	0	exklusiv	0
noHitAssembly_ c42848_g1_i1	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850 (<i>A. thaliana</i>)	0	exklusiv	0
LoliumRes_a166 469_10	Putative uncharacterized protein Sb02g040920 (<i>S. bicolor</i>)	0	6,9	0

LoliumSus_a110 432_14	Disease resistance protein RPM1 (<i>A. thaliana</i>)	0	6,0	0
LoliumRes_a848 19_28	Protein SRG1 (<i>A. thaliana</i>)	0	0	7,9
LoliumSus_a155 094_11	Protein SRG1 (<i>A. thaliana</i>)	0	0	7,3
LoliumRes_a268 348_7	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850 (<i>A. thaliana</i>)	0	0	6,4
noHitAssembly_ c37258_g1_i1	LRR receptor-like serine/threonine- protein kinase EFR (<i>A. thaliana</i>)	0	0	4,3
LoliumSus_a404 40_55	High-affinity nitrate transporter 3.1 (<i>A. thaliana</i>)	0	0	3,5
LoliumRes_a182 97_98	Two-component response regulator ARR4 (<i>A. thaliana</i>)	0	0	3,4
LoliumSus_a198 98_116	Two-component response regulator ARR4 (<i>A. thaliana</i>)	0	0	3,2
LoliumRes_a135 003_10	Indole-3-glycerol phosphate synthase, chloroplastic (<i>A. thaliana</i>)	0	0	2,9

exklusiv = ohne nachweisbare Expression im anfälligen Genotyp

3.2.3.3 Einfluss der Kronenrostinokulation auf die Genexpression der

Lolium perenne-Genotypen

Abbildung 3.16 zeigt die Anzahl hoch- und runterregulierter Transkripte in den inokulierten Genotypen im Vergleich zum jeweiligen nicht inokulierten Zeitpunkt des Genotyps. Die Anzahl überexprimierter Transkripte im zeitlichen Verlauf ist in allen Genotypen weitestgehend konstant, mit Ausnahme im AG und im RE 6 hpi. Im AG wurde über alle Zeitpunkte und Genotypen die geringste differentielle Genexpression 6 hpi, mit 3370 hoch und 743 runter regulierten Transkripten gemessen. Im RE ist dagegen zum Zeitpunkt 6 hpi mit 7387 im Vergleich zu den späteren Zeitpunkten mit 5191 und 5492 die Anzahl der hochregulierten Transkripte deutlich erhöht und weist den höchsten Wert über alle Genotypen und Zeitpunkte auf. Bei den runterregulierten Transkripten steigt die Anzahl von 6 nach 24 hpi in allen Genotypen an, mit dem höchsten Wert von 3102 Transkripten 24 hpi im RE.

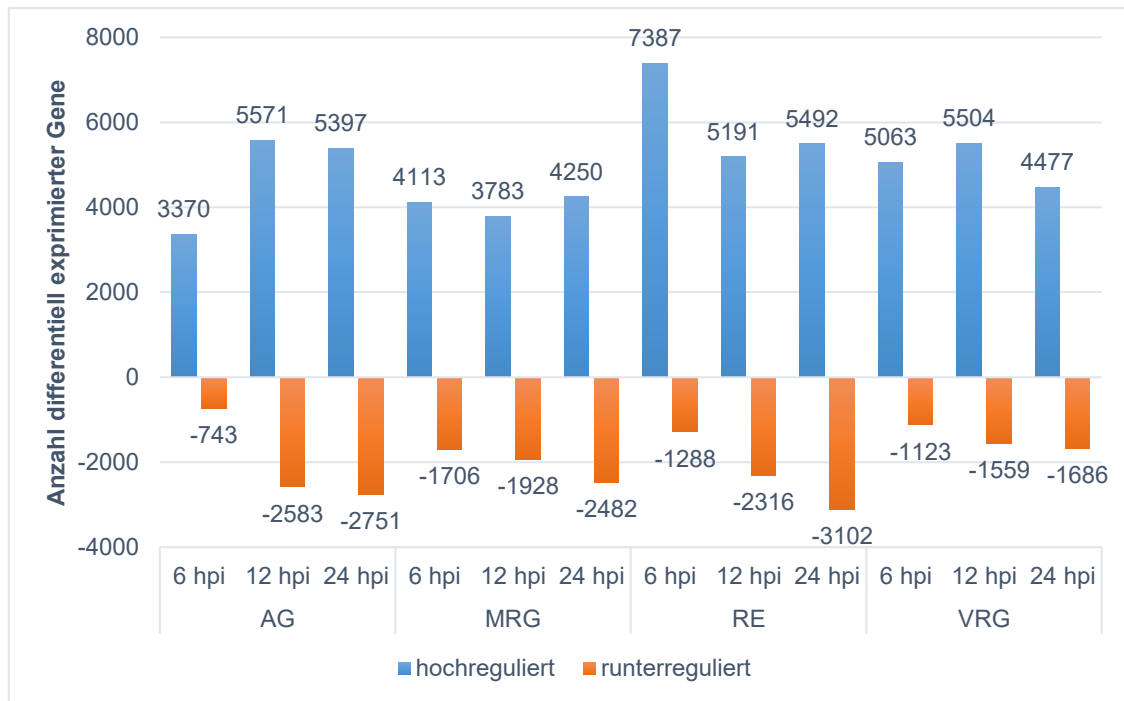


Abb. 3.16 Anzahl differentiell exprimierter Transkripte in den, mit *Puccinia coronata*, inokulierten *Lolium perenne*-Genotypen im Vergleich zum jeweiligen nicht inokulierten Zeitpunkt

3.2.3.4 „Gene Ontology“ mit überexprimierten Transkripten in den *Lolium perenne*-Genotypen induziert durch die Kronenrostinokulation

Insgesamt wurden zu allen Zeitpunkten nach Inokulation Transkripte aus 85 GOs gegenüber den nicht inokulierten Zeitpunkten signifikant überexprimiert (siehe Anhang A4). Davon wurden 38 GOs der pflanzlichen Abwehr zugeordnet, die einen weiten Bereich der abwehrinduzierten Genexpression von der Erkennung des Pathogens bis zur spezifischen Abwehrreaktion beschreiben (Tab. 3.7). Zusätzlich wurden im VRG und AG Transkripte in GOs überexprimiert, die auf eine gesteigerte Genexpression eines nicht pflanzlichen Organismus hindeuten. Davon wurden vier GOs ausschließlich im VRG („reproductive process in single-celled organism“, „sporulation resulting in formation of a cellular spore“, „reproduction of a single-celled organism“, „sporulation“) und eine GO („single-organism intracellular transport“) im AG 24 hpi signifikant überexprimiert.

Tab. 3.7 „Gene Ontology“ *Puccinia coronata*-induzierter, signifikant überexprimierter Transkripte, mit Zuordnung zur pflanzlichen Abwehr, in den *Lolium perenne*-Genotypen 6, 12 und 24 Stunden nach Inokulation mit dem Kronenrosteinsporisolat KR-SR1

GO-Identifikation	Gene Ontology-Beschreibung	VRG			RE			MRG			AG		
		6 hpi	12 hpi	24 hpi	6 hpi	12 hpi	24 hpi	6 hpi	12 hpi	24 hpi	6 hpi	12 hpi	24 hpi
GO:0006030	chitin metabolic process	3,5	4,0	3,4	5,5	2,8					4,8	3,8	4,0
GO:0006032	chitin catabolic process	3,3		3,2	5,4							3,7	
GO:0045730	respiratory burst	4,7			5,0	6,1					4,7	4,9	
GO:0016998	cell wall macromolecule catabolic process		3,4		4,2							3,3	
GO:0009800	cinnamic acid biosynthetic process	exklusiv		exklusiv				exklusiv	exklusiv	exklusiv			
GO:0009803	cinnamic acid metabolic process	exklusiv		exklusiv				exklusiv	exklusiv	exklusiv			
GO:0022413	reproductive process in single-celled organism			exklusiv									
GO:0030435	sporulation resulting in formation of a cellular spore			exklusiv									
GO:0032505	reproduction of a single-celled organism			exklusiv									
GO:0043934	sporulation			exklusiv									
GO:0002679	respiratory burst involved in defense response				4,9	6,0					4,6	4,8	
GO:0018958	phenol-containing compound metabolic process				2,3						2,0		
GO:0043069	negative regulation of programmed cell death				3,3						3,6	3,7	
GO:0060548	negative regulation of cell death				3,4						3,7	3,8	
GO:0009404	toxin metabolic process					2,9							
GO:0009407	toxin catabolic process					2,8							
GO:0009696	salicylic acid metabolic process				2,2								
GO:0009697	salicylic acid biosynthetic process				2,1								

GO:0010200	response to chitin		2,1		
GO:0046189	phenol-containing compound biosynthetic process		2,2		
GO:0009620	response to fungus				2,0
GO:0009627	systemic acquired resistance				2,0
GO:0050832	defense response to fungus				2,1
GO:1902582	single-organism intracellular transport				2,2

exklusiv = ohne nachweisbare Expression zum nicht inokulierten Zeitpunkt

3.2.3.5 Überexprimierte Transkripte in den *Lolium perenne*-Genotypen induziert durch die Kronenrostinokulation

Zu den Zeitpunkten 6, 12 und 24 hpi wurden insgesamt 545 Transkripte in den Genotypen VRG, RE, MRG und AG zu GOs mit Zuordnung zur pflanzlichen Abwehr überexprimiert (siehe Anhang A5). In Abbildung 3.17 ist die Verteilung dieser Transkripte nach ihrer Funktion dargestellt. Die Abwehr und Stress induzierten Transkripte bilden die größte Gruppe mit Homologie zu „disease resistance protein“ und „pathogenesis-related protein“-Genen sowie Genen für antifungale Proteine, wie Barwin, Wheatwin-2, Chitinasen, Glucan-endo-1,3-beta-Glukosidasen und „Heat shock“-Proteinen. Die zweitgrößte Gruppe sind die der Transkription und Signalübertragung zugeordneten Transkripte mit „receptor-like protein“-Kinasen und Transkriptionsfaktoren. Des Weiteren sind Transkripte am Transport, dem Lipidmetabolismus und an der Aminosäuresynthese beteiligt. Insgesamt wurden 363 Transkripte im AG und den Resistenztypen überexprimiert. Im VRG und dem RE wurden 20 und im VRG und dem MRG 18 identische Transkripte überexprimiert (Tab. 3.8, 3.9).

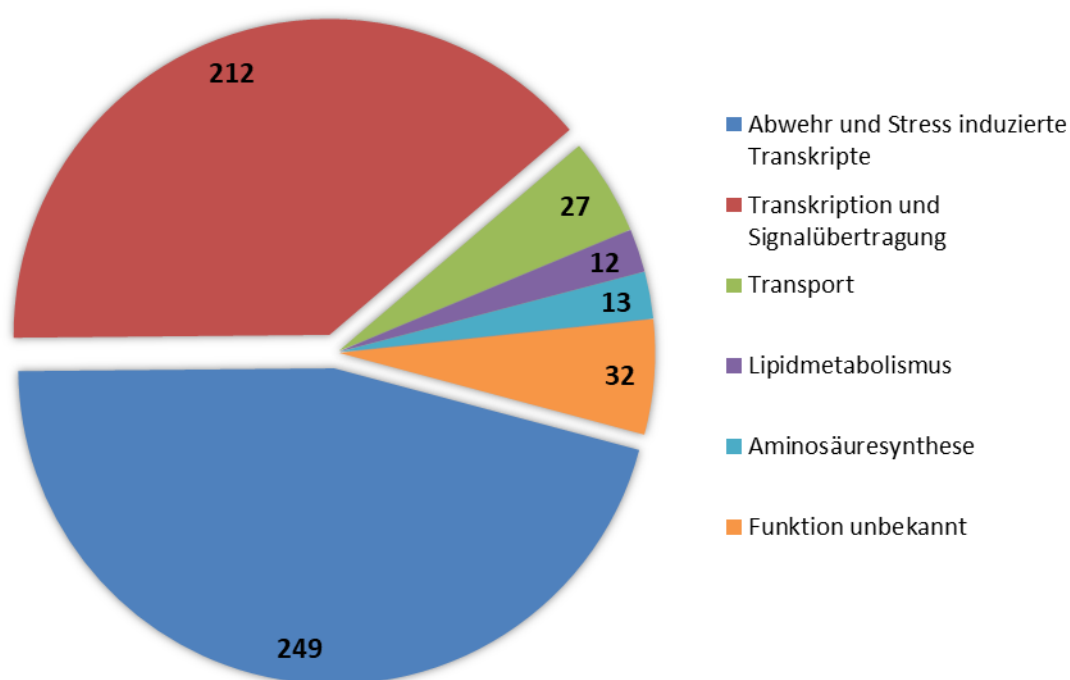


Abb. 3.17 Anzahl der abwehrspezifischen, überexprimierten Transkripte nach *Puccinia coronata*-Inokulation in allen *Lolium perenne*-Genotypen zusammengefasst nach ihrer Funktion

Tab. 3.8 Exklusiv und hoch differentiell exprimierte Transkripte im vollständig kronenrostresistenten *Lolium perenne*-Genotyp und dem resistenten Elter im Vergleich zum anfälligen Genotyp 6, 12 und 24 Stunden nach Inokulation mit dem Kronenrosteinsporisolat KR-SR1

Gen-Identifikation	Gen-Beschreibung	VRG			RE		
		6 hpi	12 hpi	24 hpi	6 hpi	12 hpi	24 hpi
Abwehr- und Stress induzierte Transkripte							
comp172872_c0_seq6	Chitinase 6 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)	exklusiv	exklusiv	exklusiv	exklusiv	exklusiv	
LoliumRes_a55289_63	Chitinase 6 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)			exklusiv			
comp167847_c4_seq8	Pathogenesis-related protein 1 (<i>A. officinalis</i>)		3,5		2,5		
LoliumSus_a106172_22	Probable NADPH:quinone oxidoreductase 1 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)	2,2				2,2	
LoliumSus_a217148_9	Putative disease resistance protein RGA4 (<i>S. bulbocastanum</i>)		4,1		2,6	2,4	2,5
comp154893_c0_seq1	Xylanase inhibitor protein 1 (<i>T. aestivum</i>)	2,8				2,6	
LoliumRes_a19384_103	Xylanase inhibitor protein 1 (<i>T. aestivum</i>)	3,6	2,1		2,7	2,6	
LoliumSus_a16931_139	Xylanase inhibitor protein 1 (<i>T. aestivum</i>)	3,6	2,0		2,3	2,2	
Transkription und Signalübertragung							
LoliumRes_a824672_3	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.2 (<i>A. thaliana</i>)		exklusiv		2,2		
LoliumRes_a55220_24	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 15a (<i>A. thaliana</i>)	2,5		2,1		2,4	
LoliumSus_a207255_10	Phytosulfokine receptor 1 (<i>A. thaliana</i>)			2,2			2,3
comp104992_c0_seq1	Pre-mRNA-splicing factor SPF27 homolog (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv	exklusiv		exklusiv	exklusiv	
LoliumRes_a29134_73	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g74360 (<i>A. thaliana</i>)	2,8	2,6	2,1	2,6		
LoliumSus_a34012_37	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g74360 (<i>A. thaliana</i>)	5,1		3,8		2,1	
LoliumSus_a19898_116	Two-component response regulator ARR4 (<i>A. thaliana</i>)			2,9			2,6
LoliumSus_a172892_13	Tyrosine-sulfated glycopeptide receptor 1 (<i>A. thaliana</i>)		4,5			2,0	
LoliumRes_a684889_4	Wall-associated receptor kinase 1 (<i>A. thaliana</i>)			4,3			exklusiv
Transport							
comp173593_c0_seq1	Transmembrane emp24 domain-containing protein p24delta5 (<i>A. thaliana</i>)		2,8		3,2		
Funktion unbekannt							
LoliumRes_a63326_60	NBS-LRR class RGA (<i>Aegilops tauschii</i>)		3,9		exklusiv		
LoliumRes_a17527_63	rRNA N-glycosidase (<i>Oryza brachyantha</i>)		5,2		4,5		

exklusiv = ohne nachweisbare Expression im anfälligen Genotyp

Tab. 3.9 Exklusiv und hoch differentiell exprimierte Transkripte im vollständig und moderat kronenrostresistenten *Lolium perenne*-Genotyp im Vergleich zum anfälligen Genotyp 6, 12 und 24 Stunden nach Inokulation mit dem Kronenrosteinsporisolat KR-SR1

Gen- Identifikation	Gen- Beschreibung	VRG			MRG		
		6 hpi	12 hpi	24 hpi	6 hpi	12 hpi	24 hpi
Abwehr- und Stress induzierte Transkripte							
comp162236_c0_seq3	(+)-neomenthol dehydrogenase (<i>Capsicum annuum</i>)			exklusiv			exklusiv
comp150396_c0_seq1	Alpha-amylase/trypsin inhibitor (<i>Z. mays</i>)			3,8	3,0	2,6	5,3
comp128715_c0_seq1	Chitinase 2 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)			3,2	4,6		6,0
comp173676_c0_seq3	Chitinase 2 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)			exklusiv			2,3
LoliumSus_a123467_18	Disease resistance protein RGA2 (<i>S. bulbocastanum</i>)			exklusiv	2,0		
LoliumRes_a166216_12	Disease resistance protein RPM1 (<i>A. thaliana</i>)	3,3		3,1	2,5	2,2	2,1
LoliumRes_a30011_122	Pathogenesis-related protein 1 (<i>H. vulgare</i>)			exklusiv			5,2
comp165814_c4_seq2	Pathogenesis-related protein STH-2 (<i>S. tuberosum</i>)	2,7	3,5	3,2		2,5	3,4
comp165814_c4_seq4	Pathogenesis-related protein STH-2 (<i>S. tuberosum</i>)	3,1	3,9	3,5		2,5	3,2
comp165814_c4_seq5	Pathogenesis-related protein STH-2 (<i>S. tuberosum</i>)	4,4	5,9	5,3		2,3	3,1
comp154752_c0_seq5	Zeamatin (<i>Z. mays</i>)			exklusiv	4,5	3,6	6,8
LoliumRes_a68140_45	Zeamatin (<i>Z. mays</i>)			exklusiv	3,5	3,1	5,6
Transkription und Signalübertragung							
LoliumRes_a336644_5	LOB domain-containing protein 41 (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv			4,6		
LoliumRes_a350286_4	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.2 (<i>A. thaliana</i>)			3,4	3,0	2,7	2,3
LoliumRes_a183494_11	Probable WRKY transcription factor 62 (<i>A. thaliana</i>)	2,2				3,0	
LoliumRes_a219869_13	Receptor-like protein kinase 5 (<i>A. thaliana</i>)	2,7			2,8	3,0	
Funktion unbekannt							
LoliumRes_a11842_62	Aldehyde dehydrogenase family 2 member C4 (<i>A. thaliana</i>)			2,2		2,2	2,6
LoliumRes_a909785_4	AST_5595 (<i>Agrostis stolonifera</i>)			3,1			2,3

* exklusiv = ohne nachweisbare Expression im anfälligen Genotyp

3.3 Vergleich der Schwarz- und Kronenrostresistenz in der Kartierungspopulation LPSR1001

3.3.1 Vergleich der Boniturmodalwerte der Phänotypisierungen zur Schwarz- und Kronenrostresistenz

Um herauszufinden, ob die Rostresistenzen in der Kartierungspopulation LPSR1001 auf einer Rostresistenz gegenüber *Puccinia graminis* und *Puccinia coronata* basieren oder ob die Resistenzen Rost-spezifisch sind, wurden die Modalwerte der Schwarzrost- und Kronenrostresistenz-Phänotypisierungen auf Korrelationen untersucht (Tab. 3.10). Dazu wurden multiple Vergleiche zwischen den Modalwerten der Phänotypisierungen durchgeführt und signifikante Korrelationen ermittelt. Dabei wurde eine signifikante Korrelation zwischen dem Kronenrostisolat aus Bocksee und den Schwarzrostisolaten aus Steinach und den USA festgestellt (Signifikanzniveau < 0.05). Weitere Korrelationen zwischen Schwarz- und Kronenrostisolaten konnten nicht nachgewiesen werden.

Tab. 3.10 Korrelationsanalyse der Boniturmodalwerte zwischen den Schwarz- und Kronenrost-Phänotypisierungen

		Schwarzrostisolate				Kronenrostisolate				
		Steinach	Malchow	Rostock	USA	Steinach	Rostock	Bocksee		
Schwarzrostisolate	Steinach		<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,38	0,08	0,03	Signifikanzwerte	
	Malchow	0,64		<0,0001	<0,0001	0,38	0,76	0,07		
	Rostock	0,69	0,70		<0,0001	0,50	0,62	0,63		
	USA	0,70	0,69	0,70		0,42	0,29	0,04		
Kronenrostisolate	Steinach	0,08	0,08	0,06	0,08		<0,0001	<0,0001		
	Rostock	0,17	0,03	0,05	0,10	0,81		<0,0001		
	Bocksee	0,20	0,17	0,05	0,19	0,42	0,49			
		Korrelationskoeffizienten								

(Rangkorrelationstest nach Spearman und Signifikanzen nach Tukey's HSD post hoc-Test)

3.3.2 Vergleich der Genexpression des schwarzrostresistenten *Lolium perenne*-Bulks mit den kronenrostresistenten *Lolium perenne*-Genotypen

Um Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den Expressionsprofilen zu identifizieren, wurden die GOs mit signifikant überexprimierten Transkripten verglichen. Übereinstimmungen zwischen den schwarzrostresistenten Bulks und den kronenrostresistenten Genotypen zeigten sich bei den GOs „cell wall modification involved in abscission“ und „cell wall disassembly“. Diese GOs zeigten überexprimierte Transkripte in den schwarzrostresistenten Bulks und den Kronenrostresistenztypen VRG und MRG (Tab. 3.11). Alle weiteren GOs sind als spezifisch für die Schwarzrost- bzw. für die Kronenrostresistenztypen zu betrachten.

Beim Vergleich von überexprimierten Transkripten zwischen den schwarzrostresistenten Bulks mit den Kronenrostresistenztypen wurden acht Übereinstimmungen identifiziert. Drei Transkripte aus den schwarzrostresistenten Bulks wurden in allen Kronenrostresistenztypen, vier im VRG und RE und ein Transkript im VRG und MRG überexprimiert. Drei Transkripte wurden ausschließlich in den schwarzrostresistenten Bulks überexprimiert (Tab. 3.12).

Tab. 3.11 „Gene Ontology“ signifikant überexprimierter Transkripte beteiligt an pflanzlichen Abwehrreaktionen in inokulierten und nicht inokulierten schwarz- und kronenrostresistenten *Lolium perenne*-Bulks/Genotypen

Gene Ontology- Identifikation	Gene Ontology- Beschreibung	Schwarzrost- resistenz	Kronenrostresistenz		
		resistente Bulks (ResAll)	VRG	RE	MRG
GO:0009830	cell wall modification involved in abscission	X	X		X
GO:0044277	cell wall disassembly	X	X		X
GO:0031640	killing of cells of other organism	X			
GO:0001906	cell killing	X			
GO:0044364	disruption of cells of other organism	X			
GO:0009626	plant-type hypersensitive response		X	X	
GO:0034050	host programmed cell death induced by symbiont		X	X	
GO:0012501	programmed cell death		X	X	
GO:0008219	cell death		X		
GO:0016265	death		X		
GO:0010363	regulation of plant-type hypersensitive response		X		
GO:0042430	indole-containing compound metabolic process		X		
GO:0045088	regulation of innate immune response		X		
GO:0009696	salicylic acid metabolic process		X		
GO:0009697	salicylic acid biosynthetic process		X		
GO:0002682	regulation of immune system process		X		
GO:0006586	indolalkylamine metabolic process		X		
GO:0019756	cyanogenic glycoside biosynthetic process		X		
GO:0042341	cyanogenic glycoside metabolic process		X		
GO:0009627	systemic acquired resistance		X		
GO:0031407	oxylipin metabolic process			X	
GO:0031408	oxylipin biosynthetic process			X	
GO:0052386	cell wall thickening			X	
GO:0052543	callose deposition in cell wall			X	
GO:0042435	indole-containing compound biosynthetic process		X		X
GO:0080037	negative regulation of cytokinin mediated signaling pathway				X

Tab. 3.12 Identische, signifikant überexprimierte Transkripte nach Schwarz- bzw. Kronenrostinokulation in schwarz- bzw. kronenrostresistenten *Lolium perenne*-Bulks/Genotypen im Vergleich zum jeweiligen anfälligen Bulk/Genotyp (log2 fold change ≥ 2)

Gen-Identifikation	Gen-Beschreibung	log2FC			
		Schwarzrost-resistenz ResAll	Kronenrost-resistenz		
			VRG	RE	MR G
Abwehr- und Stress induzierte Transkripte					
LoliumRes_a 48290_26	Disease resistance protein RPM1 (<i>A. thaliana</i>)	8,9	5,8	5,8	0,0
LoliumRes_a 37859_64	Transcription factor TGA4 (<i>A. thaliana</i>)	5,8	4,5	4,4	0,0
LoliumRes_a 91747_18	Disease resistance RPP8-like protein 3-like (BRAD11G34430) (<i>B. distachyon</i>)	5,8	8,5	8,5	0,0
LoliumRes_a 18580_131	Pathogenesis-related protein PRB1-2(<i>H. vulgare</i>)	3,4	7,3	5,4	5,9
LoliumRes_a 61717_25	Probable receptor-like protein kinase At5g47070 (<i>A. thaliana</i>)	2,9	4	0	3,4
LoliumRes_a 25059_69	Vacuolar-sorting receptor 6 (<i>A. thaliana</i>)	2,5	4,3	6,2	0,0
LoliumRes_a 55220_24	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 15a (<i>A. thaliana</i>)	2,3	8,3	6,8	7,3
LoliumRes_a 32737_43	Probable disease resistance RPP8-like protein 2 (<i>A. thaliana</i>)	2,2	6,4	5,3	5,7
LoliumRes_a 22756_71	Red chlorophyll catabolite reductase (Fragment) (<i>H. vulgare</i>)	3,3			
LoliumRes_a 30151_42	Reticuline oxidase-like protein (<i>A. thaliana</i>)	3,5			
LoliumRes_a 71891_29	Probable histone deacetylase 19 (<i>Z. mays</i>)	2,0			

3.3.3 Vergleich der Genexpression von schwarz- und kronenrost-inokulierten Bulks und Genotypen

Die Überexpression von Sequenzen mit Homologie zu „disease resistance“- „pathogenesis-related protein“-Genen und Genen, die für antifungale Proteine kodieren, wie barwin, wheatwin-2, Chitinasen, Glucan-endo-1,3-beta-Glukosidasen, Gluthationtransferasen und „Heat schock“-Proteinen ist in allen Bulks und Genotypen ähnlich. Diese Gemeinsamkeiten setzten sich in der Überexpression von Transkripten fort, die an der Transkription und der Signalübertragung beteiligt sind (Tab. 3.13).

Von den insgesamt 545 Kronenrost und 73 Schwarzrost induzierten Transkripten wurde zwischen beiden Rostresistenzen eine Überexpression von 11 Transkripten mit identischer Genidentifikation, d.h. identischen Sequenzen identifiziert (Tab. 3.13).

Tab. 3.13 Identische, signifikant überexprimierte Transkripte in schwarz-bzw. kronenrostinokulierten resistenten *Lolium perenne*-Bulks/Genotypen im Vergleich zum nicht inokulierten resistenten Bulk/Genotyp (log2 fold change ≥ 2)

Gen-Identifikation	Gen-Beschreibung	resistente Bulks		VRG			RE			MRG		
		früh	spät	6 hpi	12 hpi	24 hpi	6 hpi	12 hpi	24 hpi	6 hpi	12 hpi	24 hpi
Abwehr und Stress induziert												
LoliumRes_a 5216_338	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 13 (<i>A. thaliana</i>)	6,4	7,4									2,2
LoliumRes_a 6165_237	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GII (<i>H. vulgare</i>)	0,7	0,4	3,3	3,3	3,4						
LoliumRes_a 9509_159	Glutathione transferase GST 23 (<i>Z. mays</i>)	2,2	2	2,8	2,6							
LoliumRes_a 157432_9	Reticuline oxidase-like protein (<i>A. thaliana</i>)	-0,3	0,5	2,5	2,7	2,4						
Transkription und Signalübertragung												
LoliumRes_a 219355_11	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 7 (<i>A. thaliana</i>)	2,1	1,6			2,2						
LoliumRes_a 141091_16	Ethylene-responsive transcription factor 1B (<i>A. thaliana</i>)	2,3	0,8					3,7	3,4			
LoliumRes_a 36771_51	Ethylene-responsive transcription factor 5 (<i>A. thaliana</i>)	2,1	-0,2				3,9	2,9				
LoliumRes_a 290854_6	Ethylene-responsive transcription factor ERF094 (<i>A. thaliana</i>)	4,4	1,1	exklusiv								
LoliumRes_a 268348_7	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850 (<i>A. thaliana</i>)	0,9	2,7							2,7	3,2	2,4
verschiedene												
LoliumRes_a 536263_6	NB-ARC domain containing protein (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)	exklusiv	exklusiv			2,5						
LoliumSus_a1 99620_10	Uncharacterized protein BRADI3G19967 (<i>B. distachyon</i>)	1,8	2,3						3,2			

exklusiv = ohne nachweisbare Expression im anfälligen Genotyp

4 Diskussion

Im ersten Teil der Diskussion wird die Schwarzrostresistenzmarkerentwicklung, „*in silico*“-Kartierung von *LpPg1* und die differenzielle Genexpression zwischen schwarzrostresistenten und -anfälligen Bulks sowie inokulierten und nicht inokulierten Zeitpunkten diskutiert. Der zweite Teil beschreibt die Kronenrostresistenzen und führt die Beobachtungen aus der Phänotypisierung und den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit der resistenztyp-spezifischen Genexpression zusammen. Abschließend werden die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen der Schwarz- und Kronenrostresistenz diskutiert und die Frage beantwortet, ob beide Rostresistenzen auf einem Resistenzlokus basieren.

4.1 Schwarzrostresistenz-*LpPg1*

Die nachfolgende Tabelle gibt Auskunft über die in der Literatur beschriebenen Funktionen ausgewählter resistenzassoziierter Gene die an der *LpPg1*-vermittelten Schwarzrostresistenz beteiligt sind. Im anschließenden Text werden die einzelnen Gene, geordnet nach ihrer Funktion und Einfluss an der Resistenzausprägung von *LpPg1*, kritisch diskutiert.

Tab. 4.1 Ausgewählte Schwarzrostresistenz-assoziierte Transkripte der *LpPg1*-vermittelten Genexpression

Gen-Identifikation	Gen-Beschreibung	Funktion
LoliumRes_a 48290_26/ <i>LpETR_1</i>	Disease resistance protein RPM1 (<i>A. thaliana</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • löst hypersensitiven Zelltod aus (Boyes et al. 1998; McDowell et al. 1998)
LoliumRes_a 924483_3/ <i>LpETR_17</i>	Disease resistance protein RPM1-like (LOC100844311) (<i>B. distachyon</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • steht in Verbindung mit der Auslösung eines programmierten Zelltods in Weizen (<i>Lr10</i>-Resistenz) bei Inokulation mit <i>Puccinia triticina</i> (Feuillet et al. 2003)
LoliumRes_a 783434_3/ <i>LpETR_18</i>	Disease resistance RPP8-like protein 3-like (LOC100827328) (<i>B. distachyon</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • löst hypersensitiven Zelltod aus (Boyes et al. 1998; McDowell et al. 1998) • mögliche Beteiligung an Resistenzreaktion in <i>L. perenne</i> bei Inokulation mit <i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>lolii</i> (Muyllé et al. 2005)
LoliumRes_a 91747_18	Disease resistance RPP8-like protein 3-like (BRADI1G34430) (<i>B. distachyon</i>)	
LoliumRes_a 32737_43	Probable disease resistance RPP8-like protein 2 (<i>A. thaliana</i>)	
LoliumRes_a 549699_4/ <i>LpETR_19</i>	Putative disease resistance protein RGA1 (<i>S. bulbocastanum</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • in Verbindung mit rassenunspezifischer Resistenz gegenüber <i>P. infestans</i> in Kartoffel- und Tomatengenotypen beschrieben (Song et al. 2003; van der Vossen et al. 2003)
LoliumRes_a 230215_7	Disease resistance protein RGA2 (<i>S. bulbocastanum</i>)	
LoliumRes_a 2363_425	Premnaspirodien oxygenase (<i>Hyoscyamus muticus</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • gehört zur Cytochrome-P450-Familie und ist an der Synthese von Solanetivone, einem hochpotenten antifungalen Phytoalexin beteiligt • kommt in Nachtschattengewächsen vor und hemmt das Myzelwachstum von <i>Phytophthora infestans</i> und <i>Rhizoctonia solani</i> (Takahashi et al. 2007)
LoliumRes_a 605768_5	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2 (<i>A. thaliana</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • an der basalen Pflanzenabwehr beteiligt, induziert durch bakterielle Pathogene, in <i>Arabidopsis</i> beschrieben (Gómez-Gómez und Boller 2000; Kim et al. 2009)
LoliumRes_a 165853_16	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase SD1-13 (<i>A. thaliana</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • an der basalen Pflanzenabwehr beteiligt, induziert durch bakterielle Pathogene, in <i>Arabidopsis</i> beschrieben (Gómez-Gómez und Boller 2000; Kim et al. 2009) • fungiert als negativer Regulator der Abwehr gegenüber <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
LoliumRes_a 141091_16	Ethylene-responsive transcription factor 1B (<i>A. thaliana</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • bekannte positive Regulatoren von abwehrinduzierten Chitinasen und anderen „pathogenesis related protein“-Genen (Chen und Chen 2002; Lorenzo et al. 2003; Gutterson und Reuber 2004; McGrath et al. 2005; Pré et al. 2008; Gao et al. 2011; Moffat et al. 2012)
LoliumRes_a 36771_51	Ethylene-responsive transcription factor 5 (<i>A. thaliana</i>)	
LoliumSus_a 05426_17	Ethylene-responsive transcription factor ERF094 (<i>A. thaliana</i>)	
LoliumRes_a 290854_6	Ethylene-responsive transcription factor ERF094 (<i>A. thaliana</i>)	

LoliumRes_a 127239_24	WRKY transcription factor 18 (<i>A. thaliana</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Überexpression führt in transgenen <i>Arabidopsis</i>-Genotypen zu einer gesteigerten Expression von „pathogenesis related protein“-Genen und einer verstärkten Resistenz gegen <i>Pseudomonas syringae</i> (Chen und Chen 2002).
LoliumRes_a 37859_64/ LpETR_3	Transcription factor TGA4 (<i>A. thaliana</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • positiver Regulator von „pathogenesis related protein“-Genen und der basalen Resistenz gegen bakterielle und pilzliche Pathogene (Kesarwani et al. 2007; Wang 2011)
LoliumSus_a1 803_818, LoliumRes_a 1192_855	Barwin (<i>H. vulgare</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • bekannte antifungale Proteine aus der Gerste und dem Weizen • zeigen eine breite Wirksamkeit gegenüber pilzlichen Pathogenen (Svensson et al. 1992; Caruso et al. 1996)
LoliumRes_a 2300_676	Wheatwin-2 (<i>T. aestivum</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • wirken gegen <i>Colletotrichum graminicola</i> in Mais (Vargas et al. 2012) und wurden in inkompatiblen Reisgenotypen bei Infektion mit <i>Magnaporthe oryzae</i> gefunden (Wang et al. 2014b)
LoliumSus_a4 992_372, LoliumRes_a 5216_338, LoliumRes_a 6165_237	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 13 (<i>A. thaliana</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • hemmen das Pilzwachstum, in dem das aus Chitin und Glukan bestehende pilzliche Zellskelett angegriffen wird (Theis und Stahl 2004)
LoliumRes_a 1047_723	Endochitinase A (<i>Z. mays</i>)	
LoliumRes_a 15586_126, LoliumSus_a4 4107_54, LoliumRes_a 51325_55	Thaumatococcus-like pathogenesis-related protein 1 (<i>A. sativa</i>), Thaumatococcus-like pathogenesis-related protein 4 (<i>A. sativa</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • in vielen inkompatiblen Interaktionen zwischen Pflanzen und Rostpilzen überexprimiert (Lin et al. 1998; Rinaldi et al. 2007; Hulbert et al. 2007; Coram et al. 2008; Bozkurt et al. 2010; Wang et al. 2014a) • tragen zur gesteigerten Resistenz gegen phytopathogene Pilze in transgenem Weizen und Straußgras bei (Fu et al. 2005; Mackintosh et al. 2007)
LoliumRes_a 9509_159, LoliumRes_a 29433_56, LoliumSus_a5 5538_47	Glutathione transferase GST 23 (<i>Z. mays</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • in Verbindung mit mehreren quantitativen Resistenzen in Mais beschrieben (Wisser et al. 2011) • sind an zahlreichen Stressreaktionen, wie an der Entgiftung von Pathogen-bezogenen xenobiotischen Verbindungen beteiligt (Marrs 1996) • in der Regel unverzüglich nach Erkennung einer Infektion induziert (Hahn und Strittmatter 1994; Dean et al. 2005) und in resistenten Genotypen überexprimiert (Panthee et al. 2007; Choi et al. 2008b)

4.1.1 Markerentwicklung, „in silico“-Kartierung und *LpPg1*-vermittelte Genexpression

Zur Identifikation von Kandidatengenen und Polymorphismen für die Entwicklung von Schwarzrostresistenzmarkern wurde die NGS-Methode MACE genutzt. Insgesamt wurde die Genexpression von drei resistenten und drei anfälligen Bulks, die jeweils auf 20 Blattstücken von resistenten und 20 anfälligen Genotypen basieren, zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Es wurden Transkripte und SNPs für die Markerentwicklung ausgewählt, die ausschließlich in den resistenten Bulks vorkamen.

Von den insgesamt 30 polymorphen Markern co-segregierte *LpETR_18* mit dem Schwarzrost-Resistenzloкус *LpPg1*. *LpETR_17* und *LpETR_19* flankierten diesen im Abstand von 0,3 bzw. 1,1 cM. Alle drei Marker zeigten Homologie zu bekannten Resistenzgenen: *LpETR_17* zu RPM1, *LpETR_18* zu RPP8 und *LpETR_19* zu RGA1. Auf Grund der Co-Segregation von *LpETR_18* mit *LpPg1* ist dieses ETR ein Kandidat für das Schwarzrostresistenzgen selbst. Dem gegenüber könnte eine Ausdehnung der Kartierungspopulation in einer Detektion von Rekombinanten resultieren, die *LpETR_18* als mögliches Resistenzgen ausschließen. Um dies zu prüfen wird eine Ausdehnung der Kartierung von *LpPg1* auf eine größere Population und eine funktionelle Genstudie empfohlen. Abgesehen davon können die drei Resistenzmarker zur Selektion von Genotypen mit dem *LpPg1*-Schwarzrostresistenzloкус in der Züchtung eingesetzt werden.

Bisher haben sich nur wenige Studien mit der Schwarzrostresistenz-Markerentwicklung und der Lokalisation von Markern auf *Lolium*-Kopplungsgruppen befasst. QTLs für Schwarzrostresistenz wurden auf LG1, 6 und 7 identifiziert (Jo et al. 2008; Pfender und Slabaugh 2013). Zur Zuordnung von *LpPg1* und dessen eng korrelierender Marker zu einer *Lolium*-Kopplungsgruppe wurde die Syntenie zwischen *L. perenne* und *B. distachyon* genutzt. Wie bereits in Kapitel 3.1.2.3 beschrieben, zeigen die ETRs und SNPs Sequenzhomologie zu *Brachypodium*-Sequenzen auf Bd1, 4 und 5. Diese *Brachypodium*-Chromosomen zeigen Übereinstimmungen zu den *Lolium* Kopplungsgruppen (LG) 2, 5 und 7 (Pfeifer et al. 2013). Auf dem syntenie-basierten Gerüst-Genom nach Byrne et al. (2015) zeigte der co-segregierende Marker Sequenzhomologie zum „scaffold_3494_ref0018849“, der sich bei 78 cM

auf LG2 befindet. Dies lässt vermuten, dass sich *LpPg1* auf *Lolium* LG2 befindet. Im Gegensatz dazu hat Beckmann (2010) den hier beschriebenen Resistenzloкус *LpPg1* bereits mit SSR-Markern auf LG4 lokalisiert. Die dabei verwendeten Marker wurden in der Kopplungsanalyse mit verrechnet und gemeinsam mit *LpPg1* und den ETR- und SNP-Markern einer Kopplungsgruppe zugeordnet. Dies bestätigt die Kopplung der SSR-Marker von Beckmann (2010) mit *LpPg1*. Auf Grund der divergierenden Zuordnung von *LpPg1* zu einer spezifischen Kopplungsgruppe wird empfohlen, in weiterführenden Untersuchungen, Ankermarker aus dem „perennial ryegrass GenomeZipper“ auszuwählen, polymorphe Ankermarker in die Kopplungsanalyse aufzunehmen und dadurch *LpPg1* einer spezifischen Kopplungsgruppe zuzuordnen.

4.1.2 Differentielle und *LpPg1*-vermittelte Genexpression in den schwarzrostresistenten *Lolium perenne*-Bulks

Eine zeitnahe Erkennung von Pathogenen ist oft auf homologe Resistenzgene zurückzuführen. In diesen Untersuchungen wurden acht Transkripte identifiziert, die Homologie zu bekannten Rezeptor-ähnlichen Resistenzgenen aufweisen: *RPM1* (*LpETR_1*, *LpETR_17*), *RPP8* (*LpETR_18*), *RGA1* (*LpETR_19*) und *RGA2*. Diese Transkripte wurden zu allen inokulierten Zeitpunkten in den resistenten Bulks überexprimiert, aber nicht in den anfälligen Bulks. *RPM1* steht in Verbindung mit einer *Puccinia triticina*-Resistenz im Weizen (Feuillet et al. 2003) und *RPP8* könnte an einer Resistenz gegenüber *Puccinia coronata* f. sp. *lolii* in *L. perenne* beteiligt sein (Muylle et al. 2005), was auf einen abwehrenden Effekt beider Resistenzgene gegen pathogene Rostpilze in Getreide und Gräsern schließen lässt. Dies bestätigt die Annahme, dass das homologe *Lolium*-Transkript von *RPP8* (*LpETR_18*), welches mit *LpPg1* co-segregiert, ein naheliegender Kandidat für das *LpPg1*-Resistenzgen ist. Beide Resistenzgene, *RPM1* und *RPP8*, lösen einen hypersensitiven Zelltod bei Pathogenerkennung in Weizen bzw. *Lolium* aus (Boyes et al. 1998; McDowell et al. 1998). Zusätzlich bestätigt die 1:1-Aufspaltung der Kartierungspopulation LPSR1001 in schwarzrostresistente und -anfällige Genotypen die Annahme einer rassenspezifischen, qualitativen Resistenz (Beckmann 2010). Diese basiert auf der Erkennung des Avirulenzgens des Pathogens durch ein spezifisches Resistenzgen des Wirtes (Flor 1971). Resistenzgen-vermittelte

Abwehrreaktionen gehen in den meisten Fällen mit einem hypersensitiven Zelltod der infizierten Wirtszelle einher und verhindern damit die parasitäre Phase des Rostpathogens (Tiburzy et al. 1990; Kloppers and Pretorius 1997; Morel und Dangl 1997; Heath 1998; Bozkurt et al. 2010). Zu den in der Genexpressionsanalyse untersuchten Zeitpunkten wurde, außer den beschriebenen Resistenzgenen, keine Transkription identifiziert, die in Zusammenhang mit einem hypersensitiven Zelltod steht. Dies lässt vermuten, dass der hypersensitive Zelltod zwischen den untersuchten Zeitpunkten stattfand bzw. nach 24 hpi induziert wird.

Die hohe Anzahl von abwehrinduzierten Transkripten zum frühen Zeitpunkt im inokulierten resistenten Bulk (Tab. 3.4) lässt vermuten, dass die schnelle Erkennung des Schwarzrostes und Induktion von Abwehrprozessen wichtige Komponenten der effizienten *LpPg1*-vermittelten Resistenz sind. Zusätzlich zu *RPM1* und *RPP8* wurden die Resistenzgene *RGA1* und *RGA2* in den resistenten Bulks überexprimiert. Diese wurden für rassenunspezifische, quantitative Resistenzen beschrieben, deren Verteilung in der Phänotypisierung nicht mit der 1:1-Aufspaltung einhergeht, sondern einer Normalverteilung folgt (Miedaner 2010). Desweiteren wurden diese Resistenzgene bisher nicht mit Resistenzreaktionen gegen phytopathogene Rostpilze in Verbindung gebracht (Tab. 4.1).

Ein Transkript mit Homologie zum „premnaspirodien Oxygenase“-Gen wurde nahezu exklusiv in den resistenten Bulks exprimiert (*LoliumRes_a2363_425*) und zeigte die höchste Expressionsrate zum frühen Zeitpunkt. Als Vorstufe von Solavetivon, einem hochpotenten antifungalen Phytoalexin (Takahashi et al. 2007), deutet die Expression auf die Biosynthese eines neuen Phytoalexins in schwarzrostresistenten *L. perenne*-Genotypen hin und lässt vermuten, dass dieses Transkript ein wichtiger Bestandteil in der *LpPg1*-vermittelten Resistenz ist. Zusätzlich wurden zahlreiche Transkripte identifiziert, die an einer gesteigerten Expression von „pathogenesis-related protein“-Genen und an basalen Abwehrreaktionen beteiligt sind (Tab. 4.1). Das „LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2“- und „G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase SD1-13“-Gen sowie die Ethylen-abhängigen Transkriptionsfaktoren: ERF1B, ERF5 und ERF094 sind bekannte positive Regulatoren von abwehrinduzierten Chitinasen und anderen „pathogenesis

related protein“-Genen (Chen und Chen 2002; Lorenzo et al. 2003; Gutterson und Reuber 2004; McGrath et al. 2005; Pré et al. 2008; Gao et al. 2011; Moffat et al. 2012). Die Transkriptionsfaktoren *WRKY18* und *TGA4* führen, bei Überexpression, zu einer gesteigerten Expression von „pathogenesis related protein“-Genen und einer verstärkten Resistenz gegen bakterielle (Chen und Chen 2002) und pilzliche Pathogene (Kesarwani et al. 2007; Wang 2011). Die Expression dieser regulatorischen Gene wird durch die Überexpression von zahlreichen antifungalen Proteinen, wie: barwin, wheatwin-2, Endochitinase A, Glucan-endo-1,3-beta-Glukosidasen und „thaumatin-like pathogenesis related protein“-Genen zum frühen Zeitpunkt im resistenten Bulk bestätigt. Desweiteren zeigt die Expression von Transkripten mit Homologie zum „Glutathion transferase GST 23“-Gen (GST), welches unverzüglich nach Erkennung einer Infektion induziert (Hahn und Strittmatter 1994; Dean et al. 2005), in resistenten Genotypen überexprimiert (Panthee et al. 2007; Choi et al. 2008b) und an der Entgiftung von Pathogen-bezogenen xenobiotischen Verbindungen beteiligt ist (Marrs 1996), dass die Erkennung und Abwehrreaktion bereits zu einem frühen Stadium der Schwarzrostinfektion stattfindet. Basierend auf der Überexpression dieser abwehrinduzierten Gene wird vermutet, dass die Expression von antifungalen und „pathogenesis-related protein“-Genen im Zusammenhang mit der *LpPg1*-vermittelten Resistenz steht und ein wichtiges Element dieser Resistenz darstellen.

4.2 Kronenrostresistenz

Die nachfolgende Tabelle (Tab. 4.2) gibt Auskunft über die in der Literatur beschriebenen Funktionen ausgewählter resistenzassoziiierter Gene, die an der vollständigen und moderaten Kronenrostresistenz beteiligt sind. Im anschließenden Text werden die einzelnen Gene, geordnet nach ihrer Funktion und Einfluss an der Resistenzausprägung in den Genotypen, kritisch abgehandelt.

Tab. 4.2 Ausgewählte Kronenrostresistenz-assoziierte Transkripte der kronenrostresistenten *Lolium perenne*-Genotypen

Vollständige Kronenrostresistenz

Gen-Identifikation	Gen-Beschreibung	Funktion
LoliumRes_a3 19973_6, LoliumRes_a4 8290_26, LoliumRes_a3 29623_5	Disease resistance protein RPM1 (<i>A. thaliana</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • löst hypersensitiven Zelltod aus (Boyes et al. 1998; McDowell et al. 1998) • in Verbindung mit der Braunrostresistenz <i>Lr10</i> in Weizen beschrieben (Feuillet et al. 2003)
LoliumRes_a9 1747_18	Disease resistance RPP8-like protein 3-like (BRADI1G34430) (<i>B. distachyon</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • löst hypersensitiven Zelltod aus (Boyes et al. 1998; McDowell et al. 1998) • mögliche Beteiligung an Resistenzreaktion in <i>L. perenne</i> bei Inokulation mit <i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>lolii</i> (Muylle et al. 2005)
LoliumRes_a5 5825_27	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (<i>A. thaliana</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>LecRKs</i> sind an der unspezifischen Abwehr beteiligt • Expression wird durch Pathogeninfektion induziert • in Genotypen mit gesteigerter Resistenz überexprimiert (Singh et al. 2012; Huang et al. 2013; Singh und Zimmerli 2013; Bouwmeester et al. 2014)
LoliumRes_a6 36329_5	Receptor-like protein kinase 5 (<i>A. thaliana</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • in der Zellmembran lokalisiert und wird in der Abzissionszone von Blüten und Blättern exprimiert (Jinn et al. 2000) • an der Aktivierung der MAPK-Kaskade, der Transkription von Zellwand modifizierenden Enzymen, Abwehrreaktionen, der Ligninbiosynthese und in der Regulation der Abszission von Blütenorganen beteiligt (Jinn et al. 2000; Cho et al. 2008; Niederhuth et al. 2013)
LoliumRes_a3 2092_126	Polyol transporter 5 (<i>A. thaliana</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • in der Zellmembran lokalisierter Zuckertransporter (Klepek et al. 2005) • wird bei Verwundung von Zellen, Seneszenz und durch endogene Polygalakturonsäuren induziert • Überexpression von <i>PLT5</i> in frühen Stadien der Seneszenz • an der Rückgewinnung von Zuckern involviert (Reinders et al. 2005)

LoliumRes_a3 3830_61	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c (<i>A. thaliana</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • gehört zur Familie der Hitzeschock-Proteine • in <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> infizierten <i>A. thaliana</i>-Blättern überexprimiert • Überexpression trat mit Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auf (Noël et al. 2007)
LoliumRes_a3 7859_64	Transcription factor TGA4 (<i>A. thaliana</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • positiver Regulator von „pathogenesis related protein“-Genen und der basalen Resistenz gegen bakterielle und pilzliche Pathogene (Kesarwani et al. 2007; Wang 2011)
LoliumRes_a2 5059_69	Vacuolar-sorting receptor 6 (<i>A. thaliana</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • in Arabidopsis an der Sortierung von Speicherproteinen in die Vakuolen beteiligt • Mutanten mit ausgeschaltetem <i>VSR1</i>-Gen zeigten eine falsche Sortierung von Speicherproteinen, indem diese von den Zellen abgesondert wurden (Shimada et al. 2003)
LoliumRes_a6 84889_4	Wall-associated receptor kinase 1 (<i>A. thaliana</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Aktivierung erfolgt durch pflanzliche Peptide oder Zellwandbestandteile, die bei der Verwundung oder Infektion von pflanzlichen Zellen entstehen • Oligogalakturonsäuren werden durch <i>WAK1</i> erkannt (Brutus et al. 2010) und aktivieren die abwehrinduzierte MAPK-Kaskade (Boller und Felix 2009; Rasmussen et al. 2012; Meng und Zhang 2013) • führte in Arabidopsis zu einer gesteigerten Resistenz gegen <i>Botrytis cinerea</i> (Brutus et al. 2010) und in Reis zu einer gesteigerten Resistenz gegen <i>Magnaporthe oryzae</i> (Li et al. 2009), bzw. war überexprimiert in Reaktion auf ein inkompatibles <i>Magnaporthe oryzae</i> Isolat (Wang et al. 2014b)
LoliumSus_a1 56214_15, LoliumRes_a1 36003_20	Defensin-like protein (<i>P. integrifolia</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • im Blütenstempel von Petunien nachgewiesen und zu den „pathogenesis-related protein“-Genen gehörend (Karunanandaa et al. 1994) • hemmen breites Spektrum an Pilzen (Lay und Anderson 2005) • wird während der basalen Abwehrreaktion in den Apoplast abgegeben und greift die Zellwand von Pilzen an (Hückelhoven 2007)

Moderate Kronenrostresistenz

LoliumSus_a1 79922_11	Disease resistance protein RGA2 (<i>S. bulbocastanum</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • an breit wirksamen Resistenzen gegenüber <i>P. infestans</i> in Kartoffel- und Tomatengenotypen beteiligt (Song et al. 2003; van der Vossen et al. 2003) • in <i>Solanum demissum</i>-Genotypen mit <i>RGA2</i>-Resistenz wurde die Läsionsentwicklung von <i>P. infestans</i> erheblich verlangsamt und damit die Befallsrate deutlich reduziert
LoliumRes_a2 19869_13	Receptor-like protein kinase 5 (<i>A. thaliana</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • in der Zellmembran lokalisiert und wird in der Abzissionszone von Blüten und Blättern exprimiert (Jinn et al. 2000)
LoliumRes_a5 3588_25	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (<i>A. thaliana</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • an der Aktivierung der MAPK-Kaskade, der Transkription von Zellwand modifizierenden Enzymen, Abwehrreaktionen, der

		Ligninbiosynthese und in der Regulation der Abszission von Blütenorganen beteiligt (Jinn et al. 2000; Cho et al. 2008; Niederhuth et al. 2013)
LoliumRes_a9 8445_14	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase EFR (<i>A. thaliana</i>)	<ul style="list-style-type: none"> Erkennungsrezeptor des spezifischen bakteriellen Elongationsfaktor-Tu (<i>EF-Tu</i>) von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> induziert Pflanzenabwehr bzw. gesteigerte Resistenz gegen <i>A. tumefaciens</i> (Albert et al. 2010)
LoliumRes_a2 19355_11	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 7 (<i>A. thaliana</i>)	<ul style="list-style-type: none"> in <i>A. thaliana</i> in Verbindung mit dem Schutz der Zelle gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies im Apoplast beschrieben (Idänheimo et al. 2014) Expression von <i>CRK7</i> gekoppelt mit steigenden ROS-Level vermehrtem Zelltod und erhöhte Sensibilität gegenüber O₃ in <i>CRK7</i> (<i>crk7</i>) „Knockout“-Mutanten
LoliumRes_a5 3100_32	Brassinosteroid-signaling kinase 8 (<i>A. thaliana</i>)	<ul style="list-style-type: none"> in Zusammenhang mit verminderter Anfälligkeit gegenüber dem Falschen Mehltau in <i>A. thaliana</i> beschrieben (Qi et al. 2011; Xu et al. 2014) Beitrag zur pflanzlichen Abwehr unbekannt
LoliumSus_a1 8722_112	Membrane steroid-binding protein 2 (<i>A. thaliana</i>)	<ul style="list-style-type: none"> Einfluss auf die Phenylpropanoidbiosynthese (Hoffmann et al. 2004; Kao et al. 2005) Funktionen von Phenylpropanoidverbindungen in der pflanzlichen Abwehr reichen von der Bildung oder Induktion von physikalischen bis zu chemischen Barrieren gegen mikrobielle Infektionen (Dixon et al. 2002).
LoliumRes_a1 44624_17	Shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase (<i>A. thaliana</i>)	
LoliumRes_a1 1809_59	5'-3' Exoribonuclease 4 (<i>A. thaliana</i>)	<ul style="list-style-type: none"> in allen eukaryotischen Organismen hoch konserviert und kontrolliert selektiv den Abbau von siRNAs und miRNAs (Rymarquis et al. 2011) Überexpression von <i>XRN4</i> durch Infektion mit dem Rostpilz (<i>Cronartium quercuum</i> f. sp. <i>Fusiforme</i>) der Nordamerikanischen Weihrauchkiefer (<i>Pinus taeda</i> L.) führte zu reduzierten Level von miRNAs und einer Immunisierung des umliegenden Gewebes
LoliumRes_a5 216_338, LoliumSus_a4 992_372	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 13 (<i>A. thaliana</i>)	<ul style="list-style-type: none"> hemmen das Pilzwachstum, indem das aus Chitin und Glukan bestehende pilzliche Zellskelett angegriffen wird (Theis und Stahl 2004)
LoliumRes_a8 4819_28, LoliumSus_a1 55094_11	Protein SRG1 (<i>A. thaliana</i>)	<ul style="list-style-type: none"> in Virus infizierten <i>A. thaliana</i> Blättern identifiziert (Whitham et al. 2003) Überexpression von SRG1 während der Seneszenz von <i>A. thaliana</i> in Zellkulturlösungen nachgewiesen (Callard et al. 1996)
comp154893_c0_seq1, LoliumRes_a1 9384_103, LoliumSus_a1 6931_139	Xylanase inhibitor protein 1 (<i>T. aestivum</i>)	<ul style="list-style-type: none"> in Weizen durch Verwundung und die Infektion mit <i>Erysiphe graminis</i> induziert (Igawa et al. 2005) inhibierende Wirkung gegenüber pilzlichen endo-1,4-beta-D-Xylanasen (Payan et al. 2004; Igawa et al. 2005)

comp162236_ c0_seq3	(+)-neomenthol dehydrogenase (<i>Capsicum annuum</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • an der Bildung von Neomenthol beteiligt • gesteigerte Resistenz bei Überexpression in Genotypen von <i>C. annuum</i> und <i>A. thaliana</i> gegenüber <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> und <i>Hyaloperonospora parasitica</i> (Choi et al. 2008a)
comp150396_ c0_seq1	Alpha-amylase/trypsin inhibitor (<i>Z. mays</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • antifungale Aktivität und Sequenzhomologien zu Thaumatin (Richardson et al. 1987; Huynh et al. 1992) • Wachstum von <i>A. solani</i> und <i>F. oxysporum</i> auf Medien, versetzt mit dem Alpha-amylase/trypsin inhibitor, deutlich reduziert • ausgeprägte antifungale Aktivität dieses Proteins wird vermutet
comp128715_ c0_seq1, comp173676_ c0_seq3	Chitinase 2 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • hydrolysiert Chitin und ist an der Abwehr von Pilzpathogenen beteiligt • Überexpression führte zu einer gesteigerten Resistenz gegen <i>R. solani</i> (Datta et al. 2001)
comp154752_ c0_seq5, LoliumRes_a6 8140_45	Zeamatin (<i>Z. mays</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Protein mit antifungaler Wirkung • gehört zu den PR5-Proteinen und spielt eine wichtige Rolle in der gesteigerten Resistenz gegenüber pathogenen Pilzen (Roberts und Selitrennikoff 1990; Liu et al. 2010) • greift die Zellmembran von Pilzen an, indem es direkt in die Zellmembran eingebaut wird und Transmembranporen bildet, die die Hyphenentwicklung beeinträchtigen (Roberts und Selitrennikoff 1990)

4.2.1 Histologische Unterschiede und differentielle Genexpression zwischen dem kronenrostanfälligen und den -resistenten *Lolium perenne*-Genotypen

Schubiger und Boller (2015) untersuchten, wie sich die Pathotypenvielfalt des Kronenrostes (*Puccinia coronata* f. sp. *lolii*) in Europa zusammensetzt und fanden eine hohe Variation in Europa vor. In 2004 wurden dazu Kronenrost-Uredosporen von *L. perenne* und *L. multiflorum* infizierten Pflanzen an 28 Standorten in 11 europäischen Ländern gesammelt. Insgesamt wurden 107 Pathotypen mit unterschiedlicher Virulenz nachgewiesen. Darüber hinaus zeigte die Analyse innerhalb der Standorte eine hohe Pathotypenvielfalt. Dies stimmt mit Untersuchungen zu *P. coronata* f. sp. *avenae*, dem Hafer-Kronenrost überein. Für diese *formae speciales* von *P. coronata* wurden mehr als 290 physiologische Rassen in den USA beschrieben (Michel und Simons 1977). Bei Inokulationen

mit dem Kronenrostisolat aus Bocksee wurden, im Vergleich zu den Kronenrostisolaten aus Steinach und Rostock, keine moderat resistenten Genotypen identifiziert. Auf Grund der Kronenrostpathotypenvielfalt und der räumlichen Verteilung von verschiedenen Pathotypen innerhalb Europas (Schubiger und Boller 2015) besteht die Vermutung, dass das Kronenrostisolat aus Bocksee eine geringere Virulenz bzw. keine Pathotypen mit ausreichender Virulenz aufweist, um diesen Resistenztyp hervorzurufen. Die vergleichsweise hohe Anzahl an vollständig resistenten Genotypen inokuliert mit dem Kronenrostisolat aus Bocksee legt außerdem nahe, dass die moderat resistenten Genotypen eine Sporulation dieser Pathotypen vollständig unterbinden, bzw. die Entwicklung des Rostes soweit verlangsamt haben, dass zur Bonitur keine Symptome und Sporulation sichtbar wurden. Um einen Effekt durch unterschiedliche Pathotypen auf die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen und die Genexpressionsanalyse auszuschließen, wurde für diese Zeitreihenversuche das Einsporisolat KR-SR1 verwendet.

Erste signifikante Unterschiede in der Kronenrostentwicklung zwischen den Genotypen, traten bereits vor der Penetration der Stomata auf. Im VRG, RE und MRG kam es, im Vergleich zum AG und Aurora, zu einer signifikanten Reduktion der Appressorienbildung. Im Vergleich der Genexpressionsprofile des nicht inokulierten mit den inokulierten Zeitpunkten wurde zum Zeitpunkt 6 und 12 hpi eine Überexpression von Transkripten mit Homologie zu „pathogenesis related protein“-Genen und dem „Xylanase inhibitor protein 1“- Gen (*XIP 1*) im VRG, RE und MRG identifiziert. Die Expression von „pathogenesis related protein“-Genen und *XIP 1* führte weder zu einem vorzeitigen Ende noch zu einer verzögerten Rostentwicklung, was darauf schließen lässt, dass eine verringerte Uredosporenkeimung und Rostentwicklung auf der Blattoberfläche den Infektionsdruck abschwächen kann, aber keinen Einfluss auf die Penetration der Stomata bzw. Bildung substomatärer Vesikel hat (Jacobs 1989; Sillero und Rubiales 2002).

Zu allen inokulierten Zeitpunkten und in allen Genotypen wurden Transkripte mit Homologie zu Genen überexprimiert, die an der pflanzlichen Abwehr beteiligt sind. Auf Grund der hohen Anzahl von 363 abwehrinduzierten Transkripten, wie „pathogenesis-related protein“- und antifungal Proteingenen, die der AG zusammen mit den Resistenztypen überexprimiert, ist davon auszugehen, dass

diese nicht an der Ausprägung der Resistenzreaktionen im VRG, RE und MRG beteiligt sind. Dies steht in Übereinstimmung mit Genexpressionsanalysen zur Wirt/Parasit-Interaktion der Rostpathogene *P. striiformis* und *P. triticina* mit Weizen (Hulbert et al. 2007; Coram et al. 2008; Ma et al. 2009; Bozkurt et al. 2010). Trotz der Übereinstimmungen in der abwehrinduzierten Genexpression zwischen allen inokulierten Genotypen zeigen der VRG, RE und MRG eine Reihe von Transkripten, die exklusiv bzw. nahezu exklusiv nur in diesen Genotypen exprimiert wurden und als potentielle Kandidatengene für die Resistenzmarkerentwicklung interessant sind.

4.2.1.1 Vollständige Kronenrostresistenz

Die beobachtete Autofluoreszenzreaktion der Mesophyllzellen deutet auf eine post-haustorielle qualitative Kronenrostresistenz hin. Nach Heath (1981) und Niks und Dekens (1991) sind die Bedingungen für eine post-haustorielle, rassenspezifische Resistenz dann erfüllt, wenn das Pilzwachstum nach Bildung der ersten Haustorienmutterzelle gestoppt und in den Zellen, in denen ein Haustorium gebildet wurde, ein programmierter Zelltod eintritt. Dieser Prozess des hypersensitiven-programmierten Zelltods geht meist mit einer Autofluoreszenz der sterbenden Zellen einher und ist unter Fluoreszenzanregung sichtbar (Abb. 3.14) (Bozkurt et al. 2010). Kloppers und Pretorius (1997) beschrieben für die monogenen Lr34 und Lr37 Weizen-Resistenzen gegenüber dem Erreger des Braunrostes (*Puccinia recondita* f.sp. *tritici*), ähnliche Rostentwicklungen, wie sie im VRG und RE beobachtet wurden. In diesen Weizengenotypen stagnierte die Rostentwicklung im Mittel bei 1,5 bis 3,3 gebildeten Haustorienmutterzellen/Infektionsstelle, während zum Zeitpunkt 64 hpi eine Autofluoreszenz festgestellt wurde. Des Weiteren wurde im Hafer eine ähnliche Reaktion nach Inokulation mit dem Hafer-Kronenrost (*Puccinia coronata* f.sp. *avenae*) beschrieben (Sánchez-Martín et al. 2012). Dort kam es in resistenten Genotypen zu einem Ende der Rostentwicklung in 24 – 36 hpi. Diese Genotypen zeigten weniger als sechs HMZ/Infektion und eine Autofluoreszenz der mit HMZ in Kontakt gekommenen Mesophyllzellen, was vergleichbar mit der Rostentwicklung und den Beobachtungen im VRG und RE ist und die Annahme einer qualitativen, rassenspezifischen Resistenz bestätigt.

Die Annahme des hypersensitiven Zelltods im VRG und RE wird durch die Ergebnisse der GO- und Genexpressionanalyse gestützt. In beiden Genotypen wurden signifikant überexprimierte Transkripte zu GOs mit Verbindung zur hypersensitiven Reaktion und dem programmierten Zelltod zugeordnet (Tab. 3.5). Nach Jones und Dangl (2006) erfolgt der hypersensitive Zelltod, nachdem Effektoren bzw. das Avirulenzgen des Pathogens von einem spezifischen Resistenzgen erkannt wurde. Im Vergleich der Genexpressionsprofile des VRG und RE mit dem AG und MRG wurden hochdifferentiell bzw. exklusiv exprimierte Transkripte mit Homologie zu Resistenzgenen und Rezeptorkinasen identifiziert. In beiden Genotypen wurden vier Transkripte identifiziert, die Homologie zum Resistenzgen *RPM1* und *RPP8* aus *A. thaliana* aufweisen (Tab. 4.2). Diese wurden bereits in Zusammenhang mit der Auslösung eines hypersensitiven Zelltods in *A. thaliana* (Boyce et al. 1998), in Weizen nach Inokulation mit *Puccinia triticina* (Feuillet et al. 2003) und einer Kronenrostresistenz in *L. perenne* beschrieben (Muylle et al. 2005). Dies lässt eine direkte Beteiligung dieser Transkripte an der Kronenrostresistenz und dem hypersensitiven Zelltod vermuten. Außerdem qualifiziert es diese Transkripte zu Kandidatengenen für eine nachfolgende Kronenrostresistenzmarkerentwicklung.

Drei überexprimierte Transkripte mit Homologie zum "Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c"- (*HSC70*), „Polyol transporter 5“- (*PLT5*) und „Receptor-like protein kinase 5“-Gen (*RLK5*) stehen in Verdacht am hypersensitiven Zelltod bzw. der Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies in den penetrierten Mesophyllzellen beteiligt zu sein. *HSC70* wird durch eindringende Pathogene in die Wirtszelle (Noël et al. 2007) und durch die Bildung von ROS in den Chloroplasten induziert (Scarpeci et al. 2008). Eine Überexpression von *PLT5* wurde in frühen Stadien der Seneszenz identifiziert, in denen es an der Rückgewinnung von Zuckern beteiligt ist (Reinders et al. 2005). Die *RLK5* ist an der Aktivierung von „Mitogen-activated protein kinase“-Gen-Kaskaden (*MAPK*) involviert, einem wichtigen Element in der Aktivierung von Abwehrgenen, dem hypersensitiven Zelltod und der Synthese von antimikrobiellen Metaboliten (Meng und Zhang 2013). Jedes dieser drei Transkripte deutet auf einen beginnenden hypersensitiven Zelltod hin, der durch die Penetration der Wirtszelle durch die HMZ induziert wird.

Die Annahme wird durch die Expression von Transkripten mit Homologie zum „L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1“-Gen (*LECRK41*) im VRG und RE gestützt. Humphrey et al. (2007) vermuten, dass „L-type lectin receptor kinase“-Gene (*LecRK*) an der Überwachung der Unversehrtheit der Zellwand beteiligt sind und auf Oligogalakturonide (OG) reagieren. Diese OGs entstehen bei Verwundung bzw. dem Abbau der Zellwand während der Penetration der Wirtszelle. Es wird weiterhin davon ausgegangen, dass bei der Penetration der Wirtszellen durch die HMZ zellwandabbauende Enzyme produziert werden, die zur Überwindung der pflanzlichen Zellwand dienen (Kubicek et al. 2014). Die penetrierten Zellen reagieren auf OGs mit einer gesteigerten Genexpression von *LecRK* (Riou et al. 2002) und zeigten in *A. thaliana*-Genotypen eine gesteigerter Resistenz gegenüber *Botrytis cinerea* (Singh et al. 2012; Huang et al. 2013; Singh und Zimmerli 2013; Bouwmeester et al. 2014). In allen Kronenrost-inokulierten Genotypen waren *LecRKs* überexprimiert. Ausschließlich ein Transkript mit Homologie zum *LECRK41*-Gen (*LoliumRes_a55825_27*) wurde im VRG und RE überexprimiert und zeigte 24 hpi die höchste Genexpression. Dies lässt vermuten, dass dieses *LECRK41*-Gen an der Erkennung der Pathogen-induzierten Abbauprodukte der Zellwand zum Zeitpunkt der Penetration durch die Haustorienmutterzelle beteiligt ist und einen Einfluss auf die gesteigerte Expression von „pathogenesis-related protein“-Genen im VRG und RE hat.

Die Transkripte mit Homologie zum Transkriptionsfaktor *TGA4* und dem „Vacuolar-sorting receptor 6“-Gen (*VSR6*) unterstützen diese Vermutung und wurden in beiden Genotypen überexprimiert. *TGA4* agiert als positiver Regulator in der basalen Resistenz gegen phytopathogene Bakterien und Pilze (Kesarwani et al. 2007; Wang 2011) und ist an der Regulation von „pathogenesis-related protein“-Genen beteiligt. Wang (2011) nimmt an, dass diese TGA-Transkriptionsfaktoren abwehrbasierte Sekretionsereignisse kontrollieren, die bei Abwehrreaktionen an der Zellwand benötigt werden. *VSR6* steht in Zusammenhang mit der Sortierung von Speicherproteinen in Vakuolen und der Sekretion dieser in den Apoplast (Shimada et al. 2003). Dies lässt auf eine mögliche Interaktion von *TGA4* und *VSR6* schließen.

Trotz der Gemeinsamkeiten zwischen dem VRG und RE, wurden Transkripte mit Homologie zu „putative disease resistance protein“-Genen spezifisch für den VRG bzw. RE exprimiert. Auf Grund der Tatsache, dass in beiden Genotypen ein

programmierter Zelltod eintritt und der RE der Resistenzdonor ist, muss davon ausgegangen werden, dass beide Genotypen dasselbe Resistenzgen exprimieren, was die spezifisch für jeweils einen Genotyp exprimierten Transkripte als Kandidatengene für die Markerentwicklung ausschließt.

Im VRG wurde ein Transkript mit Homologie zum „wall-associated receptor kinase 1“-Gen (*WAK1*) (*LoliumRes_a684889_4*) überexprimiert. Die Aktivierung der *WAK1* erfolgt durch die bereits für die *LecRK* beschriebenen OGs, die während der Penetration der Zellwand durch pilzliche Polygalakturonasen freigesetzt und von der *WAK1* erkannt werden (Brutus et al. 2010). Im VRG wurde die *WAK1* um das 10-fache höher exprimiert als im RE und MRG und zeigte 24 hpi die höchste Expression. Die Überexpression von *WAK1* führt in Arabidopsis zu einer gesteigerten Resistenz gegen *Botrytis cinerea* (Brutus et al. 2010) und in Reis zu einer gesteigerten Resistenz gegen *Magnaporthe oryzae* (Li et al. 2009) bzw. war überexprimiert in Reaktion auf ein inkompatibles *M. oryzae* Isolat (Wang et al. 2014b). Dies bestätigt die Vermutung der Penetration und Erkennung des Kronenrostes durch die Wirtszelle zum Zeitpunkt 24 hpi. Zusätzlich wurden im VRG zwei Transkripte mit Homologie zum „Defensin-like protein“-Gen aus *Petunia integrifolia* überexprimiert (Karunanandaa et al. 1994). Dieses Protein hemmt ein breites Spektrum an Pilzen (Lay und Anderson 2005), wird während der basalen Abwehrreaktion in den Apoplast abgegeben und greift die Zellwand von Pilzen an (Hückelhoven 2007). Beide Transkripte wurden in allen Genotypen exprimiert, aber ausschließlich im VRG mit einem log2FC von > 3,8 24 hpi überexprimiert, was eine gesteigerte Expression dieses Gens und damit verbundene basale Abwehrreaktion im VRG 24 hpi vermuten lässt.

Zusätzlich zu den gemeinsam exprimierten Transkripten wurden zwei uncharakterisierte Transkripte mit Homologie zur *PTA.236.C1*-Sequenz in *L. perenne* im VRG und RE identifiziert. Diese Sequenz wurde von Pfeifer et al. (2013) zur *L. perenne* Kopplungsgruppe 2 (LG2) zugeordnet. Dies lässt eine mögliche Lokalisation der vollständigen Kronenrostresistenz auf LG2 vermuten und macht diese Transkripte als Kandidatengene für die Entwicklung molekularer Marker interessant. Auf dieser Kopplungsgruppe wurden bereits mehrere Kronenrostresistenzen und QTLs identifiziert (Dumsday et al. 2003; Muylle et al. 2005; Hackauf und Lellbach 2007; Studer et al. 2007; Dracatos et al. 2008). Auf Grund dessen ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die vollständige Resistenz

auf LG2 lokalisiert ist. Des Weiteren sind die beschriebenen exklusiven und überexprimierten Transkripte im VRG und RE mögliche Kandidatengene für die Entwicklung molekularer Kronenrostresistenzmarker.

4.2.1.2 Moderate Kronenrostresistenz

„Slow rusting“-Resistenzen wurden bereits in *Avena byzantina*, *Avena sativa*, *Dactylis glomerata*, *Hordeum vulgare*, *Lolium multiflorum*, *Triticum aestivum* und *Zea mays* nachgewiesen. Nach Skovmand et al. (1978) besitzen Genotypen mit einer „slow rusting“-Resistenz die Fähigkeit die Rostentwicklung zu verlangsamen. Die Resistenz kann durch verschiedene Vergleiche identifiziert werden, unter anderem durch Rostentwicklungskurven und dem Beginn der Sporulation (Wilcoxson 1981). Im MRG war sowohl die Rostentwicklungskurve der HMZ-Entwicklung im Vergleich zum AG und Aurora signifikant reduziert, als auch die Sporulation um ca. zwei Tage verzögert (Abb. 3.13, 3.9). Zum Zeitpunkt 36 hpi zeigten der VRG und MRG signifikant weniger HMZ als der RE. Dieser Unterschied setzte sich zwischen dem VRG und RE bis zum Zeitpunkt 60 hpi fort und lässt vermuten, dass der VRG zusätzlich zur qualitativen, rassenspezifischen Resistenz auch Träger der „slow rusting“-Resistenz sein könnte. Die Vermutung der Doppelresistenz im VRG wird durch die gemeinsame Expression von zahlreichen abwehrinduzierten Transkripten im VRG und MRG und der nicht vorhandenen Expression dieser Transkripte im RE gestützt. Beide Genotypen exprimieren insgesamt sieben Transkripte mit Homologie zu „disease resistance protein“-Genen. Die Resistenzgene *RPP8*, *RPP13*, *R1C-3* („late blight resistance protein“), *At5g47070* („Putative disease resistance protein“), *Sb02g040920* („putative disease resistance protein“) und *RPM1* sind für monogene Resistenzen beschrieben worden (Grant et al. 1995; McDowell et al. 1998; Bittner-Eddy et al. 2000; Kuang et al. 2005) und vermutlich nicht an der „slow rusting“ Resistenz beteiligt. Im Gegensatz dazu wurden drei Transkripte mit Homologie zum *RGA2*-Resistenzgen identifiziert, dass an breit wirksamen Resistenzen gegenüber *P. infestans* in Kartoffel- und Tomatengenotypen beschrieben wurde (Song et al. 2003; van der Vossen et al. 2003). In *Solanum demissum*-Genotypen mit *RGA2*-Resistenz wurde die Läsionsentwicklung von *P. infestans* erheblich verlangsamt und damit die Befallsrate deutlich reduziert. Diese verzögerte Pathogenentwicklung ist vergleichbar mit der verzögerten

Rostentwicklung und Sporulation im MRG. Im VRG und MRG wurden die drei Transkripte mit Homologie zu *RGA2* gegenüber dem AG exklusiv exprimiert, was diese Transkripte zu Kandidatengenen für eine spätere Markerentwicklung qualifiziert. *RGA2* wurde bisher nicht mit Resistenz gegen Rostpilze in Gräsern in Verbindung gebracht.

Des Weiteren wurden in beiden Genotypen Transkripte mit Homologie zu Rezeptorkinasen überexprimiert. Dazu zählen die bereits in Kapitel 4.2.1.1 beschriebenen *RLK5*- und *LECRK41*-Gene, die an der Aktivierung von Abwehrgenen bzw. an der Überwachung des Zellwandzustandes beteiligt sind und in Genotypen mit gesteigerter Resistenz überexprimiert wurden (Singh et al. 2012; Huang et al. 2013; Singh und Zimmerli 2013; Bouwmeester et al. 2014). In diesem Zusammenhang wurde auch das „LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase EFR“-Gen identifiziert (Albert et al. 2010). Welchen Einfluss dieser Rezeptor auf die Erkennung bzw. Abwehr von pilzlichen Pathogenen hat, ist bisher unbekannt. Im Gegensatz dazu wurde das „Cysteine-rich receptor-like protein kinase 7“-Gen (*CRK7*) in *A. thaliana* in Verbindung mit dem Schutz der Zelle gegenüber ROS im Apoplast beschrieben (Idänheimo et al. 2014). Mit steigendem Level an ROS stieg die Expression von *CRK7* an. In „Knockout“-Mutanten von *CRK7* (*crk7*) kam es zu einem vermehrten Zelltod und einer erhöhten Sensibilität gegenüber O₃, was auf einen möglichen Schutzmechanismus vor ROS durch *CRK7* und eine Konzentration von ROS im Apoplast des VRG und MRG hindeutet. Exklusiv nur im MRG wurden zwei Transkripte mit Homologie zum „Protein SRG1“-Gen (*SRG1*) exprimiert. Callard et al. (1996) wiesen eine Überexpression von *SRG1* während der Seneszenz von *A. thaliana* Zellkulturlösungen nach, was eine Beteiligung von *SRG1* an der Seneszenz von Pflanzenteilen vermuten lässt. Trotz der Überexpression von Transkripten mit Homologie zu *CRK7* und *SRG1*, die mit ROS und Seneszenz in Zusammenhang stehen, wurde weder in den fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen noch in der GO-Analyse ein Hinweis auf eine hypersensitive Reaktion im MRG festgestellt. Außerdem hätte die Konzentration von *CRK7* mit einer erhöhten Genexpression von Klasse III Peroxidasen und/oder NADPH-Oxidasen einhergehen müssen, die für die Bildung von ROS verantwortlich sind (O'Brien et al. 2012). Im Gegensatz dazu wurde zu keinem Zeitpunkt eine erhöhte Expression dieser Peroxidasen im VRG und MRG gemessen. Dies lässt

vermuten, dass die gebildeten ROS auf einen definierten Bereich, wie den Apoplast, konzentriert waren und keine hypersensitive Reaktion auslösten. Die Überexpression von *CRK7* als Schutzmechanismus gegenüber ROS könnte dafür eine Erklärung sein. Um die Vermutung der durch ROS verursachten, verzögerten Rostentwicklung zu bestätigen oder abzulehnen wird empfohlen, weitere fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen im Zeitraum von 24 bis 60 hpi mit Diaminobenzidin (DAB) gefärbten Blattsegmenten nach Thordal-Christensen et al. (1997) durchzuführen. DAB polymerisiert in Bereichen mit hoher Peroxidaseaktivität zu einem braunen Polymer und wurde mehrfach zur Detektion von ROS-spezifischen Abwehrreaktionen zwischen Rostpilzen und Gräsern eingesetzt (Wang et al. 2007; Melichar et al. 2008; Zhang et al. 2012; Serfling et al. 2016). Neben der Abwehrreaktion durch ROS können antifungale Proteine die Entwicklung des Kronenrostes ebenfalls verlangsamt haben. Im MRG und VRG wurde die höchste Genexpression von Transkripten mit Homologie zum „Chitinase 2“- , „(+)-neomenthol dehydrogenase“- , „Alpha-amylase/trypsin inhibitor“- und „Zeamatin“-Gen 24 hpi gemessen. Zusätzlich zeigten zwei Transkripte mit Homologie zum „Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 13“-Gen 24 hpi eine um mehr als das 100-fache erhöhte Expression im VRG und MRG verglichen mit dem AG und RE. Dies ist in Übereinstimmung mit Genexpressionsanalysen zur *Yr5*-Resistenz einer „slow rusting“-Resistenz im Weizen gegen den Gelbrost (*Puccinia striiformis* sub.sp. *tritici*), bei der die Genexpression von antifungal Proteinen 24 hpi ihren Höhepunkt erreichte (Coram et al. 2008; Chen et al. 2013). Wie bereits beschrieben, wird zu diesem Zeitpunkt die Penetration der Mesophyllzellen erwartet, was die Überexpression von abwehr- und stressinduzierten Genen erklärt. Insbesondere die Genexpression antifungaler Proteingene, war in allen Genotypen 24 hpi stark erhöht und zeigte in nahezu allen Transkripten die höchste Expression im MRG (siehe Anhang A5). Dies lässt erwarten, dass diese Transkripte einen erheblichen Anteil an der „slow rusting“-Resistenz haben. Dadurch konnte die Entwicklung des Kronenrostes im MRG gehemmt bzw. die HMZ-Anzahl im VRG gegenüber dem RE signifikant verringert werden. Des Weiteren ist ein Einfluss von Transkripten mit Homologie zu Genen, die an der Phenylpropanoidbiosynthese beteiligt sind, nicht auszuschließen. Die Funktionen von Phenylpropanoidverbindungen in der pflanzlichen Abwehr reichen von der

Bildung oder Induktion von physikalischen bis zu chemischen Barrieren gegen mikrobielle Infektionen und decken ein breites Spektrum von antimikrobieller Aktivität ab (Dixon et al. 2002). Dazu zählen die Transkripte mit Homologie zum „Membrane steroid-binding proteins 2“- (*MAPR2*) und dem „Shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase“-Gen die an der Phenylpropanoidbiosynthese beteiligt sind (Hoffmann et al. 2004; Kao et al. 2005).

Im Gegensatz dazu kontrolliert das „5'-3' Exoribonuclease 4“-Gen (*XRN4*) selektiv den Abbau von siRNAs und miRNAs und ist in allen eukaryotischen Organismen hoch konserviert (Rymarquis et al. 2011). Diese RNAs sind wesentliche regulatorische Komponenten der pflanzlichen Abwehr gegen Bakterien und Pilze. Lu et al. (2007) zeigte, dass es bei Überexpression von *XRN4* bei der Infektion der Nordamerikanischen Weihrauchkiefer (*Pinus taeda* L.) mit dem Rostpilz (*Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme*) zu einem reduzierten Level von miRNAs kam und damit eine Immunisierung des nicht infizierten umliegenden Gewebes erfolgte, was vor einer Ausbreitung des Pilzes schützte. Ein weiteres Transkript, das einen möglichen Anteil an der „slow rusting“-Resistenz im MRG haben könnte, ist das „Brassinosteroid-signaling kinase 8“-Gen (*BSK8*). Dieses wurde in Zusammenhang mit verminderter Anfälligkeit gegenüber dem Falschen Mehltau in *A. thaliana* beschrieben. Eine genaue Beschreibung der Funktion bzw. in welchem Umfang die *BSK8* zu möglichen Abwehrreaktionen in der Pflanze beiträgt, liegt bisher nicht vor.

4.3 Vergleich der Schwarz- und Kronenrostresistenz

Die hohen Korrelationskoeffizienten und niedrigen Signifikanzwerte innerhalb der Schwarz- bzw. Kronenrostphänotypisierungen ($p < 0.0001$) lassen eine weitestgehend homogene Pathotypenzusammensetzung der Schwarz- bzw. Kronenrostfeldisolate vermuten. Dies ist in Übereinstimmung mit den Untersuchungen zur Kronenrostpathotypenzusammensetzung in Europa (Schubiger und Boller 2015). Ausschließlich das Schwarzrostfeldisolat aus Steinach und das Kronenrostfeldisolat aus Bocksee sind signifikant miteinander korreliert ($p = 0,03$). Die Korrelation dieser beiden Rostisolate kommt durch die, verglichen mit den zwei anderen Kronenrostisolaten, hohe Anzahl an vollständig resistenten Genotypen zustande, was eine größere Übereinstimmung der Modalwerte mit dem Schwarzrostfeldisolat aus Steinach zur Folge hat. Um

diesen Effekt, hervorgerufen durch Feldisolate mit einer geringen Virulenz, entgegenzuwirken, wird ein Signifikanzniveau von $p < 0,01$ empfohlen (Beckmann et al. 2010; Schubiger und Boller 2015). Die Vergleiche der Modalwerte der Schwarz- und Kronenrostphänotypisierungen zeigten nicht, dass schwarzrostresistente Genotypen ebenfalls resistent gegenüber den Kronenrostisolaten sind, was auf zwei unabhängig von einander vererbte Resistenzen hindeutet.

Die Unterschiede zwischen der Schwarz- und Kronenrostresistenz setzen sich in den Genexpressionsanalysen fort. Die vergleichende Aufstellung der überexprimierten Transkripte mit Zuordnung zu GOs der pflanzlichen Abwehr in Tabelle 3.11 stellt die Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den Expressionsprofilen der resistenten Bulks/Genotypen dar. In den schwarzrostresistenten Bulks (ResAll) wurden Transkripte exprimiert, die an der direkten Tötung von Fremdorganismen beteiligt sind. Im Gegensatz dazu werden in den Kronenrostresistenztypen VRG- und RE-Transkripte exprimiert, die die fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen eines programmierten Zelltods bestätigen. Ein programmierter Zelltod in den schwarzrostresistenten Genotypen kann trotzdem nicht ausgeschlossen werden. Dieser kann zu einem späteren Zeitpunkt als im VRG und RE eintreten.

Von den in Tabelle 3.12 dargestellten elf überexprimierten Transkripten in den resistenten Bulks wurden acht in den Kronenrostresistenztypen überexprimiert, davon sieben gemeinsam im VRG und RE und vier im MRG. Darunter sind drei Transkripte mit Homologie zu potentiellen Resistenzgenen. Das Transkript *LoliumRes_a48290_26* mit Homologie zu *RPM1* zeigt in der Markerentwicklung einen Polymorphismus zwischen schwarzrostresistenten und -anfälligen Genotypen, war aber mit 57 cM von *LpPg1* zu weit entfernt, um als Kandidat für *LpPg1* in Frage zu kommen. Die zwei verbleibenden Transkripte wurden nicht in die Markerentwicklung aufgenommen, da diese sowohl in den resistenten als auch in den anfälligen Bulks exprimiert wurden. Für die Markerentwicklung zur Kronenrostresistenz können diese Transkripte als mögliche Kandidatengene für die qualitative Kronenrostresistenz in Betracht gezogen werden, da sie nahezu exklusiv im VRG und RE vorkommen. Interessant ist auch, dass die Transkripte, auf denen der co-segregierende und die beiden flankierenden Schwarzrostresistenz-Marker basieren, in den Kronenrostresistenztypen nicht

(*LpETR_17*) bzw. nur in geringem Umfang exprimiert wurden (*LpETR_18*, *LpETR_19*). Dies unterstreicht die Vermutung, dass die Schwarz- und Kronenrostresistenz auf unterschiedlichen Resistenzen basiert. Eine 100%ige Aussage kann jedoch erst getroffen werden, wenn für jede Resistenz das spezifische Resistenzgen identifiziert wurde, bzw. durch die Resistenzmarkerentwicklung eine Kopplung beider Resistenzloki ausgeschlossen wurde.

Basierend auf den Korrelationskoeffizienten der Schwarz- und Kronenrostphänotypisierung und der Genexpressionanalysen ist davon auszugehen, dass beide Resistenzen unabhängig von einander vererbt werden.

5 Schlussfolgerungen

Die hier dargestellten Untersuchungen kommen zu dem Schluss, dass die Kartierungspopulation LPSR1001 eine vielversprechende Resistenzquelle für die Schwarz- und Kronenrostresistenzzüchtung ist. Die anfängliche Annahme, dass die Schwarz- und Kronenrostresistenzen auf einem Resistenzloкус basieren, konnte durch die Resistenz-Phänotypisierungen und die Genexpressionsanalysen nicht bestätigt werden. Beide Rostresistenzen werden unabhängig voneinander vererbt.

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmalig die Entwicklung von Transkriptom-basierten molekularen Rostresistenz-Markern in einer hochgradig heterozygoten *L. perenne*-Population. Mit der Kombination aus der NGS-basierten Methode „Massive Analysis of cDNA Ends“ (MACE) und „Bulked Segregant Analysis“ wurden zahlreiche resistenzspezifische exklusiv exprimierte Transkripte und SNPs identifiziert, die zur Kartierung des Schwarzrostresistenzloкус *LpPg1* eingesetzt wurden. Diese ermöglichten die kosteneffiziente Entwicklung von Schwarzrostresistenzmarkern für die markergestützte Selektion und eine Feinkartierung von *LpPg1*. Die Lokalisation von *LpPg1* mittels „in silico“-Kartierung und unter Verwendung des „perennial ryegrass GenomeZipper“ zeigte Syntenie der resistenzassoziierten Transkripte zu LG2 und 7. Dabei wurde der co-segregierende Marker *LpETR_18* auf LG2 lokalisiert, was mit hoher Wahrscheinlichkeit die Position von *LpPg1* beschreibt. Eine abschließende Bestätigung der Lokalisation von *LpPg1* durch Ankermarker wird empfohlen. Des Weiteren wurde in den resistenten Bulks eine rasche Induktion von potentiellen Resistenzgenen, signal- und stressinduzierten Genen, Transkriptionsfaktoren, „pathogenesis-related protein“-Genen und einem für Gräser bisher nicht beschriebenen Phytoalexinsyntheseweg identifiziert. Damit lässt die hier beschriebene Methode, zusätzlich zur Schwarzrostresistenzmarkerentwicklung, eine Aussage über die Abwehrmechanismen der *LpPg1*-vermittelten Schwarzrostresistenz zu und eröffnet neue Informationen über die Genexpression von schwarzrostinokulierten resistenten Genotypen.

Die Phänotypisierung mit Kronenrostfeldisolaten identifizierte zwei Kronenrostresistenzen in der LPSR1001 Kartierungspopulation. Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen und Genexpressionsanalysen mit

diesen Kronenrostresistenztypen wurden eine qualitative und eine quantitative Kronenrostresistenz nachgewiesen. Die qualitative Kronenrostresistenz basiert auf einem hypersensitiven Zelltod, der in Mesophyllzellen ausgelöst wird, die durch HMZ penetriert werden und führt zu einer vollständigen Resistenz. Die quantitative „slow rusting“-Kronenrostresistenz beruht höchstwahrscheinlich auf einer Überexpression von Transkripten, die an der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies im Apoplast der Mesophyllzellen beteiligt sind und/oder einer Überexpression von antifungalen Proteinen. Dies führt, im Vergleich zu anfälligen Genotypen, zu einer verzögerten und verringerten Kronenrostsporulation. Für beide Kronenrostresistenzen liegen umfangreiche Daten, von der Entwicklung der Kronenroststrukturen bis zur Genexpression in diesen Resistenztypen, vor. Damit bildet diese Arbeit eine Grundlage für nachfolgende Untersuchungen zu qualitativen und „slow rusting“-Kronenrostresistenzen in *L. perenne* und den ersten Schritt für die Entwicklung von Kronenrostresistenz-Markern für die *Lolium*-Züchtung.

6 Zusammenfassung

Um molekulare Schwarzrostresistenzmarker für die *L. perenne*-Kartierungspopulation LPSR1001 zu entwickeln, wurde die NGS-Methode „Massive Analysis of cDNA Ends“ (MACE) mit der „Bulked Segregant Analysis“ (BSA) kombiniert. Durch eine Schwarzrostresistenz-Phänotypisierung mit Schwarzrostfeldisolaten unterschiedlicher Herkunft wurden vollständig resistente und hochanfällige Genotypen ausgewählt. Für die Genexpressionsanalysen wurden Bulks aus Blattsegmenten von 20 resistenten bzw. 20 anfälligen Genotypen zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der Inokulation gebildet. Die Genexpression von resistenten und anfälligen Bulks wurde verglichen und resistenzspezifische exklusiv und hochdifferentiell exprimierte Transkripte und SNPs in den resistenten Bulks identifiziert. Basierend auf diesen Sequenzen wurden Schwarzrost-Resistenzmarker mit enger Kopplung zum Schwarzrostresistenzlocus-*LpPg1* entwickelt, von denen zwei Marker *LpPg1* flankieren und ein Marker mit dem Resistenzlocus co-segregierte. Eine „*in silico*“-Kartierung der resistenzassoziierten Transkripte und Marker unter Verwendung des „perennial ryegrass GenomeZipper“ lokalisierte zahlreiche Transkripte auf Kopplungsgruppe 2 und 7, sowie den co-segregierenden Marker *LpETR_18* auf Kopplungsgruppe 2 von *L. perenne*. Zur Identifikation der *LpPg1*-vermittelten Abwehrreaktion wurden die inokulierten mit dem nicht-inokulierten Zeitpunkt verglichen. Dabei wurde in den Genexpressionprofilen der resistenten Bulks eine Abwehrreaktion zwischen 4 und 8 hpi identifiziert, die auf der Genexpression von antifungalen Proteinen und Phytoalexinen basiert.

Durch eine Phänotypisierung der Kartierungspopulation LPSR1001 mit Kronenrostfeldisolaten wurden, zusätzlich zur Schwarzrostresistenz *LpPg1*, zwei Kronenrostresistenzen identifiziert. In der Phänotypisierung wurden zwei Resistenztypen identifiziert, die eine vollständige Resistenz, ohne Sporulation und eine moderate Resistenz mit einer zeitlich verzögerten und verringerten Sporulation zeigten. Für jede Resistenz wurde ein Genotyp sowie der resistente Elter und ein anfälliger Genotyp ausgewählt und die Kronenrostentwicklung fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert. 60 hpi wurde im vollständig resistenten Genotyp und dem resistenten Elter eine Autofluoreszenz der mit Haustorienmutterzellen in Kontakt gekommenen Mesophyllzellen dokumentiert.

Im moderat resistenten Genotyp wurde eine verzögerte Haustorienmutterzellenbildung nachgewiesen, die in der Literatur als „slow rusting“-Resistenz beschrieben wird. Die Genexpressionsprofile der untersuchten Genotypen zeigen für jede Resistenz spezifische Transkripte, an Hand derer die Resistenzen unterschieden werden können. Im vollständig resistenten Genotyp und im resistenten Elter wurden Transkripte mit Funktion am hypersensitiven Zelltod überexprimiert und bestätigen damit die Beobachtungen der fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen. Im moderat resistenten und vollständig resistenten Genotyp wurden zahlreiche Transkripte mit Homologie zu antifungalen Proteinen überexprimiert. Die Übereinstimmungen in der resistenzassoziierten Expression zwischen dem vollständig resistenten und dem moderat resistenten Genotyp sowie dem vollständig resistenten Genotyp mit dem resistenten Elter geben Hinweise auf eine Doppelresistenz im vollständig resistenten Genotyp.

Die Phänotypisierungen zur Schwarz- und Kronenrostresistenz in der Kartierungspopulation waren nicht miteinander korreliert. Ein Vergleich der Genexpression der schwarzrostresistenten Bulks mit den kronenrostresistenten Genotypen identifizierte 11 identische Transkripte, die an unspezifischen Abwehrreaktionen beteiligt sind. Dies lässt auf eine getrennte Vererbung der Schwarz- und Kronenrostresistenzen schließen.

Abstract

The aim of this study was to identify candidate genes involved in stem rust resistance, to develop stem rust resistance specific molecular markers and to characterize crown rust resistances in the highly heterozygous forage crop *L. perenne*.

The NGS-based transcriptome profiling technique massive analysis of cDNA ends (MACE) in combination with bulked segregant analysis was used. To identify highly resistant and susceptible genotypes for BSA, the mapping population was phenotyped for stem rust resistance with four stem rust field isolates from different regions. For transcription profiling by MACE, leaf segments of 20 fully resistant and 20 highly susceptible genotypes from the mapping population were selected. Leaf segments for transcription profiling were harvested right before inoculation and at 4, 8, 18, and 24 h after inoculation (hai). Leaves from 4 and 8 hai and 18 and 24 hai were bulked, giving a total of six different samples for MACE. Genexpression profiles of stem rust resistant and susceptible bulks were compared and exclusively expressed resistance specific and highly differentially expressed transcripts and SNPs in resistant bulks were identified. Based on these sequences, we were able to develop stem rust resistance specific molecular markers with strong linkage to the *LpPg1* resistance locus. Two markers flanked and one co-segregated with the *LpPg1* locus. To predict the genomic location of the closely linked markers and resistance specific transcripts on *L. perenne* linkage groups, an *in silico*-mapping in combination with the perennial ryegrass GenomeZipper was used. Most of them were localized on *Lolium* LG 2 and 7. Sequence of the co-segregating marker LpETR_18 showed homology to scaffold_3494_ref0018849 at 78 cM on *Lolium* LG2, assuming the location of *LpPg1* in this region. In addition, MACE also enabled us to investigate how the *LpPg1* gene orchestrates gene expression of the efficient resistance mechanism. Most informative was the comparison of gene expression between all infected and non-inoculated bulks. Here, the early resistant bulk revealed the highest induction of plant defense processes, based on gene expression of antifungal proteins and phytoalexins.

In addition, the same mapping population carrying the stem rust resistance locus *LpPg1* were phenotyped for crown rust resistance with three different field

isolates. The population showed different levels of resistance: most of the individuals were fully resistant, some were moderate resistant and very few were highly susceptible to *P. coronata*. Histological analyses were conducted to characterize fungal development and resistance reactions in a fully resistant, moderate resistant, highly susceptible genotype and in addition the resistant parent and the highly susceptible variety "Aurora". Two types of crown rust disease resistance responses were observed. In the fully resistant genotype and the resistant parent crown rust development stopped at haustorial mother cell formation at 36 hours post inoculation. Cell autofluorescence was seen in mesophyll cells in direct contact with primary haustorial mother cells at 60 hours post inoculation, indicating a hypersensitive cell death in both genotypes. In the moderate resistant genotype, a delayed haustorial mother cell formation in comparison to the highly susceptible genotype and "Aurora" was observed. Gene expression analyses revealed crown rust resistance specific gene expression profiles which can separate fully resistant and moderate resistant genotypes. Compared to the susceptible *Lolium* genotype, in the fully resistant genotype and the resistant parent expression of genes involved in hypersensitive cell death were identified, which was evidenced by autofluorescence of mesophyll cells 60 hours post inoculation. In the moderate resistant and fully resistant genotype numerous genes were up-regulated coding for antifungal proteins. Similarities between the fully resistant and moderate resistant, and also between the fully resistant and resistant parent indicating both crown rust resistances are present in the fully resistant genotype.

The phenotyping of stem and crown rust resistance in the mapping population was not correlated and a comparison of the gene expression of stem rust resistant bulks with crown-rust-resistant genotypes identified 11 identical transcripts involved in unspecific defense reactions. In summary, there is no correlated inheritance between the stem and crown rust resistances.

7 Literatur

- Abberton MT, Marshall AH, Humphreys MW, Macduff JH, Collins RP, Marley CL (2008) Genetic Improvement of Forage Species to Reduce the Environmental Impact of Temperate Livestock Grazing Systems. *Adv Agron* 98:311–355.
- Albert M, Jehle AK, Mueller K, Eisele C, Lipschis M, Felix G (2010) *Arabidopsis thaliana* pattern recognition receptors for bacterial elongation factor tu and flagellin can be combined to form functional chimeric receptors. *J Biol Chem* 285:19035–19042.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410.
- Beckmann K (2010) Entwicklung eines In-vitro-Resistenztests für den Erreger des Schwarzrostes (*Puccinia graminis* ssp. *graminicola*) an Deutschem Weidelgras (*Lolium perenne* L.) und molekulare Charakterisierung eines dominanten Resistenzgens. Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants.
- Beckmann K, Eickmeyer F, Lellbach H, Schubiger FX, Hartmann S, Wehling P (2010) Development of molecular markers for stem-rust resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and their utilisation in breeding programmes. In: 60.Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 2009. Lehr- und Forschungszentrum für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein, Irdning, pp 101–104.
- Bittner-Eddy PD, Crute IR, Holub EB, Beynon JL (2000) *RPP13* is a simple locus in *Arabidopsis thaliana* for alleles that specify downy mildew resistance to different avirulence determinants in *Peronospora parasitica*. *Plant J* 21:177–188.
- Boeckmann B, Blatter M-C, Famiglietti L, Hinz U, Lane L, Roehert B, Bairoch A (2005) Protein variety and functional diversity: Swiss-Prot annotation in its biological context. *C R Biol* 328:882–899.
- Bojahr J, Nhengiwa O, Krezdorn N, Rotter B, Saal B, Ruge-Wehling B, Struck C, Winter P (2016) Massive analysis of cDNA ends (MACE) reveals a co-segregating candidate gene for *LpPg1* stem rust resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Theor Appl Genet* 129:1915–1932.
- Boller T, Felix G (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60:379–406.
- Bonos SA, Clarke BB, Meyer WA (2006) Breeding for disease resistance in the major cool-season turfgrasses. *Annu Rev Phytopathol* 44:213–234.
- Bouwmeester K, Han M, Blanco-Portales R, Song W, Weide R, Guo LY, van der Vossen E a G, Govers F (2014) The *Arabidopsis* lectin receptor kinase LecRK-I.9 enhances resistance to *Phytophthora infestans* in Solanaceous plants. *Plant Biotechnol J* 12:10–16.

- Boyce DC, Nam J, Dangl JL (1998) The *Arabidopsis thaliana* RPM1 disease resistance gene product is a peripheral plasma membrane protein that is degraded coincident with the hypersensitive response. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15849–15854.
- Bozkurt TO, McGrann GRD, McCormack R, Boyd L A., Akkaya MS (2010) Cellular and transcriptional responses of wheat during compatible and incompatible race-specific interactions with *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Mol Plant Pathol* 11:625–640.
- Brutus A, Sicilia F, Macone A, Cervone F, De Lorenzo G (2010) A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:9452–9457.
- Byrne SL, Nagy I, Pfeifer M, Armstead I, Swain S, Studer B, Mayer K, Campbell JD, Czaban A, Hentrup S, Panitz F, Bendixen C, Hedegaard J, Caccamo M, Asp T (2015) A synteny-based draft genome sequence of the forage grass *Lolium perenne*. *Plant J* 84:816–826.
- Callard D, Axelos M, Mazzolini L (1996) Novel molecular markers for late phases of the growth cycle of *Arabidopsis thaliana* cell-suspension cultures are expressed during organ senescence. *Plant Physiol* 112:705–15.
- Caruso C, Caporale C, Chilosi G, Vacca F, Bertini L, Magro P, Poerio E, Buonocore V (1996) Structural and antifungal properties of a pathogenesis-related protein from wheat kernel. *J Protein Chem* 15:35–44.
- Chen C, Chen Z (2002) Potentiation of developmentally regulated plant defense response by *AtWRKY18*, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiol* 129:706–716.
- Chen X, Coram T, Huang X, Wang M, Dolezal A (2013) Understanding Molecular Mechanisms of Durable and Non-durable Resistance to Stripe Rust in Wheat Using a Transcriptomics Approach. *Curr Genomics* 14:111–26.
- Chibucos MC, Collmer CW, Torto-Alalibo T, Gwinn-Giglio M, Lindeberg M, Li D, Tyler BM (2009) Programmed cell death in host-symbiont associations, viewed through the Gene Ontology. *BMC Microbiol* 9 Suppl 1:S5.
- Cho SK, Larue CT, Chevalier D, Wang H, Jinn T-L, Zhang S, Walker JC (2008) Regulation of floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:15629–15634.
- Choi HW, Lee BG, Kim NH, Park Y, Lim CW, Song HK, Hwang BK (2008a) A role for a menthone reductase in resistance against microbial pathogens in plants. *Plant Physiol* 148:383–401.
- Choi JJ, Alkharouf NW, Schneider KT, Matthews BF, Frederick RD (2008b) Expression patterns in soybean resistant to *Phakopsora pachyrhizi* reveal the importance of peroxidases and lipoxygenases. *Funct Integr Genomics* 8:341–359.
- Coram TE, Huang X, Zhan G, Settles ML, Chen X (2010) Meta-analysis of transcripts associated with race-specific resistance to stripe rust in wheat demonstrates common induction of blue copper-binding protein, heat-stress transcription factor, pathogen-induced *WIR1A* protein, and ent-kaurene synthase transcripts. *Funct Integr Genomics* 10:383–392.

- Coram TE, Wang M, Chen X (2008) Transcriptome analysis of the wheat – *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* interaction. *Mol Plant Pathol* 9:157–169.
- Datta K, Tu J, Oliva N, Ona I, Velazhahan R, Mew TW, Muthukrishnan S, Datta SK (2001) Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. *Plant Sci* 160:405–414.
- Dean JD, Goodwin PH, Hsiang T (2005) Induction of glutathione S-transferase genes of *Nicotiana benthamiana* following infection by *Colletotrichum destructivum* and *C. orbiculare* and involvement of one in resistance. *J Exp Bot* 56:1525–1533.
- Deschamps S, Campbell MA. (2009) Utilization of next-generation sequencing platforms in plant genomics and genetic variant discovery. *Mol Breed* 25:553–570.
- Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Reddy MSS, Wang L (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence - A genomics perspective. *Mol Plant Pathol* 3:371–390.
- Dracatos PM, Cogan NOI, Dobrowolski MP, Sawbridge TI, Spangenberg GC, Smith KF, Forster JW (2008) Discovery and genetic mapping of single nucleotide polymorphisms in candidate genes for pathogen defence response in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theor Appl Genet* 117:203–219.
- Dracatos PM, Cogan NOI, Keane PJ, Smith KF, Forster JW (2010) Biology and Genetics of Crown Rust Disease in Ryegrasses. *Crop Sci* 50:1605.
- Dracatos PM, Cogan NOI, Sawbridge TI, Gendall AR, Smith KF, Spangenberg GC, Forster JW (2009a) Molecular characterisation and genetic mapping of candidate genes for qualitative disease resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *BMC Plant Biol* 9:62.
- Dracatos PM, Dobrowolski MP, Lamb J, Olle RS, Gendall AR, Cogan NOI, Smith KF, Forster JW (2009b) Development of genetically homogenised populations of the crown rust pathogen (*Puccinia coronata* f. sp. *lolii*) for disease trait dissection in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Australian J Exp Agric* 39:361–378.
- Dumsday JL, Smith KF, Forster JW, Jones ES (2003) SSR-based genetic linkage analysis of resistance to crown rust (*Puccinia coronata* f. sp. *lolii*) in perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Plant Pathol* 52:628–637.
- Feuillet C, Travella S, Stein N, Albar L, Nublat A, Keller B (2003) Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15253–15258.
- Fischer K, Dieterich R, Nelson MN, Kamphuis LG, Singh KB, Rotter B, Krezdorn N, Winter P, Wehling P, Ruge-Wehling B (2015) Characterization and mapping of *LanrBo*: a locus conferring anthracnose resistance in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Theor Appl Genet*. 128: 2121-2130.
- Flor HH (1971) Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annu Rev Phytopathol* 9:275–296.

- Fu D, Tisserat NA, Xiao Y, Settle D, Muthukrishnan S, Liang GH (2005) Overexpression of rice *TLPD34* enhances dollar-spot resistance in transgenic bentgrass. *Plant Sci* 168:671–680.
- Gao Z, Chung E-H, Eitas TK, Dangl JL (2011) Plant intracellular innate immune receptor Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 1 (*RPM1*) is activated at, and functions on, the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:7619–7624.
- Gómez-Gómez L, Boller T (2000) FLS2: An LRR Receptor-like Kinase Involved in the Perception of the Bacterial Elicitor Flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell* 5:1003–1011.
- Goya R, Sun MGF, Morin RD, Leung G, Ha G, Wiegand KC, Senz J, Crisan A, Marra MA, Hirst M, Huntsman D, Murphy KP, Aparicio S, Shah SP (2010) SNVMix: Predicting single nucleotide variants from next-generation sequencing of tumors. *Bioinformatics* 26:730–736.
- Graichen FAS, Martinelli JA, Lima Wesp C de, Federizzi LC, Chaves MS (2011) Epidemiological and histological components of crown rust resistance in oat genotypes. *Eur J Plant Pathol* 131:497–510.
- Grant MR, Godiard L, Straube E, Ashfield T, Lewald J, Sattler A, Innes RW, Dangl JL (1995) Structure of the *Arabidopsis RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* 269:843–846.
- Guo B, Fedorova ND, Chen X, Wan C-H, Wang W, Nierman WC, Bhatnagar D, Yu J (2011) Gene expression profiling and identification of resistance genes to *Aspergillus flavus* infection in peanut through EST and microarray strategies. *Toxins (Basel)* 3:737–53.
- Gutterson N, Reuber TL (2004) Regulation of disease resistance pathways by *AP2/ERF* transcription factors. *Curr Opin Plant Biol* 7:465–471.
- Hackauf B, Lellbach H (2007) Mapping of *LmPc*, a major dominant gene from *Lolium multiflorum* conferring resistance to crown rust. *Proc XXVIIth EUCARPIA Symp Improv Fodd Crop amenity grasses*, Copenhagen, Denmark, 19th to 23rd August 2007 77–82.
- Hahn K, Strittmatter G (1994) Pathogen-defence gene *prp1-1* from potato encodes an auxin-responsive glutathione S-transferase. *Eur J Biochem* 226:619–626.
- Hahn M, Mendgen K (2001) Signal and nutrient exchange at biotrophic plant – fungus interfaces. *Curr Opin Plant Biol* 4:322–327.
- Hahn M, Neef U, Struck C, Göttfert M, Mendgen K (1997) A Putative Amino Acid Transporter Is Specifically Expressed in Haustoria of the Rust Fungus *Uromyces fabae*. *Mol Plant Microbe In* 10:438–445.
- Hampton JG (1986) Fungicidal effects on stem rust, green leaf area, and seed yield in “Grasslands Nui” perennial ryegrass. *New Zeal J Exp Agric* 14:7–12.
- Harder DE, Chong J (1984) Structure and Physiology of Haustoria. In: *The Cereal Rusts*, Vol. 1. Origins, Specificity, Structure, and Physiology. USA: Academic press, Orlando, pp 431–476.
- Heath C (1998) Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *Eur J Plant Pathol* 104:117–124.

- Heath MC (1981) Resistance of Plants to Rust Infection. *Phytopathology* 71:971.
- Hirata M, Cai H, Inoue M, Yuyama N, Miura Y, Komatsu T, Takamizo T, Fujimori M (2006) Development of simple sequence repeat (SSR) markers and construction of an SSR-based linkage map in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *Theor Appl Genet* 113:270–279.
- Hoffmann L, Besseau S, Geoffroy P, Ritzenthaler C, Meyer D, Lapierre C, Pollet B, Legrand M (2004) Silencing of Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A Shikimate/ Quinate Hydroxycinnamoyltransferase Affects Phenylpropanoid Biosynthesis. *Plant Cell* 16:1446–1465.
- Huang P, Ju HW, Min JH, Zhang X, Kim SH, Yang KY, Kim CS (2013) Overexpression of L-type lectin-like protein kinase 1 confers pathogen resistance and regulates salinity response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 203–204:98–106.
- Hückelhoven R (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu Rev Phytopathol* 45:101–127.
- Hulbert SH, Bai J, Fellers JP, Pacheco MG, Bowden RL (2007) Gene expression patterns in near isogenic lines for wheat rust resistance gene *lr34/yr18*. *Phytopathology* 97:1083–1093.
- Humphrey T V., Bonetta DT, Goring DR (2007) Sentinels at the wall: Cell wall receptors and sensors. *New Phytol* 176:7–21.
- Huynh QK, Borgmeyer JR, Zobel JF (1992) Isolation and characterization of a 22 kDa protein with antifungal properties from maize seeds. *Biochem Biophys Res Commun* 182:1–5.
- Idänheimo N, Gauthier A, Salojärvi J, Siligato R, Brosché M, Kollist H, Mähönen AP, Kangasjärvi J, Wrzaczek M (2014) The *Arabidopsis thaliana* cysteine-rich receptor-like kinases *CRK6* and *CRK7* protect against apoplastic oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 445:457–462.
- Igawa T, Tokai T, Kudo T, Yamaguchi I, Kimura M (2005) A Wheat Xylanase Inhibitor Gene, *Xip-I*, but Not *Taxi-I*, Is Significantly Induced by Biotic and Abiotic Signals That Trigger Plant Defense. *Biosci Biotechnol Biochem* 69:1058–1063.
- Jacobs T (1989) Germination and appressorium formation of wheat leaf rust on susceptible, partially resistant and resistant wheat seedlings and on seedlings of other Gramineae. *Netherlands J Plant Pathol* 95:65–71.
- Jing F, Jiao-Jiao X, Rin-Ming L, Yue-Qiu H, Shi-Chang X (2013) Genetic analysis and location of gene for resistance to stripe rust in wheat international differential host Strubes Dickkopf. *J Genet* 92:267–72.
- Jinn TL, Stone JM, Walker JC (2000) *HAESA*, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes Dev* 14:108–117.
- Jo Y-K, Barker R, Pfender W, Warnke S, Sim S-C, Jung G (2008) Comparative analysis of multiple disease resistance in ryegrass and cereal crops. *Theor Appl Genet* 117:531–543.
- Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444:323–329.

- Kahl G, Molina C, Rotter B, Jüngling R, Frank A, Krezdorn N, Hoffmeier K, Winter P (2012) Reduced representation sequencing of plant stress transcriptomes. *J Plant Biochem Biotechnol* 21:119–127.
- Kao A, Chang T, Chang S, Su J, Yang C (2005) Characterization of a novel *Arabidopsis* protein family *AtMAPR* homologous to 25-Dx / IZAg/nHpr6.6 proteins. *Bot Bull Acad Sin* 46:107–118.
- Karunanandaa B, Singh A, Kao TH (1994) Characterization of a predominantly pistil-expressed gene encoding a gamma-thionin-like protein of *Petunia inflata*. *Plant Mol Biol* 26:459–464.
- Kesarwani M, Yoo J, Dong X (2007) Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 144:336–346.
- Kim HS, Jung MS, Lee SM, Kim KE, Byun H, Choi MS, Park HC, Cho MJ, Chung WS (2009) An S-locus receptor-like kinase plays a role as a negative regulator in plant defense responses. *Biochem Biophys Res Commun* 381:424–428.
- Kimbeng CA (1999) Genetic basis of crown rust resistance in perennial ryegrass, breeding strategies, and genetic variation among pathogen populations: a review. *Aust J Exp Agric* 39:361.
- Klepek Y-S, Geiger D, Stadler R, Klebl F, Landouar-Arsivaud L, Lemoine R, Hedrich R, Sauer N (2005) *Arabidopsis* POLYOL TRANSPORTER5, a new member of the monosaccharide transporter-like superfamily, mediates H⁺-Symport of numerous substrates, including myo-inositol, glycerol, and ribose. *Plant Cell* 17:204–218.
- Kloppers FJ, Pretorius ZA (1997) Effects of combinations amongst genes *Lr13*, *Lr34* and *Lr37* on components of resistance in wheat to leaf rust. *Plant Pathol* 46:737–737.
- Kuang H, Wei F, Marano MR, Wirtz U, Wang X, Liu J, Shum WP, Zaborsky J, Tallon LJ, Rensink W, Lobst S, Zhang P, Tornqvist CE, Tek A, Bamberg J, Helgeson J, Fry W, You F, Luo MC, Jiang J, Robin Buell C, Baker B (2005) The *R1* resistance gene cluster contains three groups of independently evolving, type I *R1* homologues and shows substantial structural variation among haplotypes of *Solanum demissum*. *Plant J* 44:37–51.
- Kubicek CP, Starr TL, Glass NL (2014) Plant Cell Wall-Degrading Enzymes and Their Secretion in Plant-Pathogenic Fungi. *Annu Rev Phytopathol* 1–25.
- Lay FT, Anderson MA (2005) Defensins-components of the innate immune system in plants. *Curr Protein Pept Sci* 6:85–101.
- Lellbach H (1994) Blattstück-Test zur Beurteilung der Resistenz gegen Kronenrost (*Puccinia coronata*) bei *Lolium* sp. In: 36. Fachtagung des DLG-Ausschusses Gräser, Klee und Zwischenfrüchte am 7. und 8. Dezember 1994, Fulda. pp 89–97.
- Lenuweit U, Gharadjedaghi B (2002) Biologische Basisdaten zu *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum*, *Festuca pratensis* und *Trifolium repens*. Umweltbundesamt.
- Leonard KJ, Szabo LJ (2005) Stem rust of small grains and grasses caused by *Puccinia graminis*. *Mol Plant Pathol* 6:99–111.

- Li H, Zhou SY, Zhao WS, Su SC, Peng YL (2009) A novel wall-associated receptor-like protein kinase gene, *OsWAK1*, plays important roles in rice blast disease resistance. *Plant Mol Biol* 69:337–346.
- Lin KC, Bushnell WR, Smith AG, Szabo LJ (1998) Temporal accumulation patterns of defence response gene transcripts in relation to resistant reactions in oat inoculated with *Puccinia graminis*. *Physiol Mol Plant Pathol* 52:95–114.
- Liu J-J, Sturrock R, Ekramoddoullah AKM (2010) The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Rep* 29:419–436.
- Livaja M, Wang Y, Wieckhorst S, Haseneyer G, Seidel M, Hahn V, Knapp SJ, Taudien S, Schön C-C, Bauer E (2013) BSTA: a targeted approach combines bulked segregant analysis with next- generation sequencing and de novo transcriptome assembly for SNP discovery in sunflower. *BMC Genomics* 14:628.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15:165–178.
- Lu S, Sun Y-H, Amerson H, Chiang VL (2007) MicroRNAs in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) and their association with fusiform rust gall development. *Plant J* 51:1077–1098.
- Ma J, Huang X, Wang X, Chen X, Qu Z, Huang L, Kang Z (2009) Identification of expressed genes during compatible interaction between stripe rust (*Puccinia striiformis*) and wheat using a cDNA library. *BMC Genomics* 10:586.
- Ma Q, Shang HS (2009) Ultrastructure of stripe rust (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*) interacting with slow rusting, highly resistant and susceptible wheat cultivars. *J Plant Pathol* 91:597–606.
- Mackintosh CA, Lewis J, Radmer LE, Shin S, Heinen SJ, Smith LA, Wyckoff MN, Dill-Macky R, Evans CK, Kravchenko S, Baldrige GD, Zeyen RJ, Muehlbauer GJ (2007) Overexpression of defense response genes in transgenic wheat enhances resistance to *Fusarium* head blight. *Plant Cell Rep* 26:479–488.
- Mamo BE, Smith KP, Brueggeman RS, Steffenson BJ (2015) Genetic Characterization of Resistance to Wheat Stem Rust Race TTKSK in Landrace and Wild Barley Accessions Identifies the *rpg4/Rpg5* Locus. *Phytopathology* 105:99–109.
- Manickavelu A, Kawaura K, Oishi K, Shin-I T, Kohara Y, Yahiaoui N, Keller B, Suzuki A, Yano K, Ogihara Y (2010) Comparative gene expression analysis of susceptible and resistant near-isogenic lines in common wheat infected by *Puccinia triticina*. *DNA Res* 17:211–22.
- Marrs K A. (1996) the Functions and Regulation of Glutathione S-Transferases in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:127–158.
- Mattner SW, Parbery DG (2007) Crown rust affects plant performance and interference ability of Italian ryegrass in the post-epidemic generation. *Grass Forage Sci* 62:437–444.

- McDowell JM, Dhandaydham M, Long TA, Aarts MG, Goff S, Holub EB, Dangi JL (1998) Intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the *RPP8* locus of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1861–1874.
- McGrath KC, Dombrecht B, Manners JM, Schenk PM, Edgar CI, Maclean DJ, Scheible W-R, Udvardi MK, Kazan K (2005) Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of *Arabidopsis* transcription factor gene expression. *Plant Physiol* 139:949–959.
- Melichar JPE, Berry S, Newell C, MacCormack R, Boyd LA (2008) QTL identification and microphenotype characterisation of the developmentally regulated yellow rust resistance in the UK wheat cultivar Guardian. *Theor Appl Genet* 117:391–399.
- Mendiburu F de (2016) Statistical Procedures for Agricultural Research. *Agric. Stat. Proced. Agric. Res. R Packag. version 1.2-0*. 1.
- Meng S, Brown DE, Ebbole DJ, Torto-Alalibo T, Oh YY, Deng J, Mitchell TK, Dean RA (2009) Gene Ontology annotation of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *BMC Microbiol* 9 Suppl 1:S8.
- Meng X, Zhang S (2013) MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annu Rev Phytopathol* 51:245–66.
- Michel LJ, Simons MD (1977) Aggressiveness and virulence of *Puccinia coronata avenae* isolates, 1971-1975. *Plant Dis Report* 61:621–625.
- Miedaner T (2010) Grundlagen der Pflanzenzüchtung. DLG-Verlag, Frankfurt am Main.
- Moffat CS, Ingle R A, Wathugala DL, Saunders NJ, Knight H, Knight MR (2012) *ERF5* and *ERF6* play redundant roles as positive regulators of JA/Et-mediated defense against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. *PLoS One* 7:1–11.
- Morel J, Dangi JL (1997) The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Differ* 4:671–683.
- Muylle H, Baert J, Van Bockstaele E, Pertijs J, Roldán-Ruiz I (2005) Four QTLs determine crown rust (*Puccinia coronata* f. sp. *lolii*) resistance in a perennial ryegrass (*Lolium perenne*) population. *Heredity (Edinb)* 95:348–357.
- Niederhuth CE, Cho SK, Seitz K, Walker JC (2013) Letting go is never easy: Abscission and receptor-like protein kinases. *J Integr Plant Biol* 55:1251–1263.
- Niks RE, Dekens RG (1991) Prehaustorial and Posthaustorial Resistance to Wheat Leaf Rust in Diploid Wheat Seedlings. *Phytopathology* 81:847.
- Noël LD, Cagna G, Stuttmann J, Wirthmüller L, Betsuyaku S, Witte C-P, Bhat R, Pochon N, Colby T, Parker JE (2007) Interaction between *SGT1* and cytosolic/nuclear *HSC70* chaperones regulates *Arabidopsis* immune responses. *Plant Cell* 19:4061–4076.

- Nold-Petry C A, Lo CY, Rudloff I, Elgass KD, Li S, Gantier MP, Lotz-Havla AS, Gersting SW, Cho SX, Lao JC, Ellisdon AM, Rotter B, Azam T, Mangan NE, Rossello FJ, Whisstock JC, Bufler P, Garlanda C, Mantovani A, Dinarello CA, Nold MF (2015) *IL-37* requires the receptors *IL-18R α* and *IL-1R8* (SIGIRR) to carry out its multifaceted anti-inflammatory program upon innate signal transduction. *Nat Immunol* 16:354–365.
- O'Brien J A, Daudi A, Butt VS, Bolwell GP (2012) Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* 236:765–79.
- Panthee DR, Yuan JS, Wright DL, Marois JJ, Mailhot D, Stewart CN (2007) Gene expression analysis in soybean in response to the causal agent of Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) in an early growth stage. *Funct Integr Genomics* 7:291–301.
- Parra-González LB, Aravena-Abarzúa GA, Navarro-Navarro CS, Udall J, Maughan J, Peterson LM, Salvo-Garrido HE, Maureira-Butler IJ (2012) Yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) transcriptome sequencing: molecular marker development and comparative studies. *BMC Genomics* 13:425.
- Payan F, Leone P, Porciero S, Furniss C, Tahir T, Williamson G, Durand A, Manzanares P, Gilbert HJ, Juge N, Roussel A (2004) The dual nature of the wheat xylanase protein inhibitor *XIP-I*: Structural basis for the inhibition of family 10 and family 11 xylanases. *J Biol Chem* 279:36029–36037.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30:36.
- Pfeifer M, Martis M, Asp T, Mayer KFX, Lubberstedt T, Byrne S, Frei U, Studer B (2013) The Perennial Ryegrass GenomeZipper: Targeted Use of Genome Resources for Comparative Grass Genomics. *PLANT Physiol* 161:571–582.
- Pfender W (2009) A damage function for stem rust of perennial ryegrass seed crops. *Phytopathology* 99:498–505.
- Pfender WF, Saha MC, Johnson EA, Slabaugh MB (2011) Mapping with RAD (restriction-site associated DNA) markers to rapidly identify QTL for stem rust resistance in *Lolium perenne*. *Theor Appl Genet* 122:1467–1480.
- Pfender WF, Slabaugh ME (2013) Pathotype-specific QTL for stem rust resistance in *Lolium perenne*. *Theor Appl Genet* 126:1213–1225.
- Plummer RM, Hall RL, Watt TA (1990) The influence of crown rust (*Puccinia coronata*) on tiller production and survival of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) plants in simulated swards. *Grass Forage Sci* 45:9–16.
- Potter LR (1987) Effect of crown rust on regrowth, competitive ability and nutritional quality of perennial and Italian ryegrasses. *Plant Pathol* 36:455–461.
- Pré M, Atallah M, Champion A, De Vos M, Pieterse CMJ, Memelink J (2008) The *AP2/ERF* domain transcription factor *ORA59* integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiol* 147:1347–1357.
- Qi Y, Tsuda K, Glazebrook J, Katagiri F (2011) Physical association of pattern-triggered immunity (PTI) and effector-triggered immunity (ETI) immune receptors in *Arabidopsis*. *Mol Plant Pathol* 12:702–708.

- Randhawa M, Bansal U, Valárik M, Klocová B, Doležel J, Bariana H (2014) Molecular mapping of stripe rust resistance gene *Yr51* in chromosome 4AL of wheat. *Theor Appl Genet* 127:317–24.
- Rasmussen MW, Roux M, Petersen M, Mundy J (2012) MAP Kinase Cascades in *Arabidopsis* Innate Immunity. *Front Plant Sci* 3:1–6.
- Reheul D, Ghesquiere A. (1996) Breeding perennial ryegrass with better crown rust resistance. *Plant Breed* 115:465–469.
- Reinders A, Panshyshyn JA, Ward JM (2005) Analysis of transport activity of *Arabidopsis* sugar alcohol permease homolog *AtPLT5*. *J Biol Chem* 280:1594–1602.
- R development core Team (2008) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Richardson M, Valdes-Rodriguez S, Blanco-Labra A (1987) A possible function for thaumatin and a TMV-induced protein suggested by homology to a maize inhibitor. *Nature* 329:432–434.
- Rinaldi C, Kohler A, Frey P, Duchaussoy F, Ningre N, Couloux A, Wincker P, Le Thiec D, Fluch S, Martin F, Duplessis S (2007) Transcript Profiling of Poplar Leaves upon Infection with Compatible and Incompatible Strains of the Foliar Rust. *Plant Physiol* 144:347–366.
- Riou C, Hervé C, Pacquit V, Dabos P, Lescure B (2002) Expression of an *Arabidopsis* lectin kinase receptor gene, *lecRK-al*, is induced during senescence, wounding and in response to oligogalacturonic acids. *Plant Physiol Biochem* 40:431–438.
- Roberts WK, Selitrennikoff CP (1990) Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *J Gen Microbiol* 136:1771–1778.
- Roelfs AP (1985) Wheat and Rye Stem Rust. In: *The Cereal Rust Vol II*. Cereal Rust Laboratory, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, University of Minnesota, St. Paul, Minnesota, pp 3–37.
- Rohringer R, Kim WK, Samborski DJ, Howes NK (1977) Calcofluor: An Optical Brightener for Fluorescence Microscopy of Fungal Plant Parasites in Leaves. *Phytopathology* 67:808–810.
- Rose-Fricker CA., Meyer WA, Kronstad WE (1986) Inheritance of Resistance to Stem Rust (*Puccinia graminis* subsp. *graminicola*) in Six Perennial Ryegrass (*Lolium perenne*) Crosses. *Plant Dis* 70:678–681.
- Rymarquis L A, Souret FF, Green PJ (2011) Evidence that *XRN4*, an *Arabidopsis* homolog of exoribonuclease *XRN1*, preferentially impacts transcripts with certain sequences or in particular functional categories. *RNA* 17:501–511.
- Salgado LR, Koop DM, Pinheiro DG, Rivallan R, Le Guen V, Nicolás MF, de Almeida LGP, Rocha VR, Magalhães M, Gerber AL, Figueira A, Cascardo JCDM, de Vasconcelos AR, Silva WA, Coutinho LL, Garcia D (2014) De novo transcriptome analysis of *Hevea brasiliensis* tissues by RNA-seq and screening for molecular markers. *BMC Genomics* 15:236.

- Sánchez-Martín J, Rubiales D, Sillero JC, Prats E (2012) Identification and characterization of sources of resistance in *Avena sativa*, *A. byzantina* and *A. strigosa* germplasm against a pathotype of *Puccinia coronata* f.sp. *avenae* with virulence against the *Pc94* resistance gene. *Plant Pathol* 61:315–322.
- Scarpeci TE, Zanol MI, Valle EM (2008) Investigating the role of plant heat shock proteins during oxidative stress. *Plant Signal Behav* 3:856–857.
- Schubiger FX, Baert J, Ball T, Cagas B, Czembor E, Feuerstein U, Gay A, Hartmann S, Jakesova H, Klima M, Krautzer B, Leenheer H, Persson C, Pietraszek W, Poinsard L, Posselt UK, Quitté Y, Romani M, Russi L, Schulze S, Tardin MC, Van Nes M, Willner E, Wolters L, Boller B (2013) The EUCARPIA Multi-site Rust Evaluation—Results 2010. In: *Breeding strategies for sustainable forage and turf grass improvement*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 209–217
- Schubiger FX, Baert J, Bayle B, Bourdon P, Cagas B, Cernoch V, Czembor E, Eickmeyer F, Feuerstein U, Hartmann S, Jakesova H, Johnston D, Krautzer B, Leenheer H, Lellbach H, Persson C, Pietraszek W, Posselt UK, Romani M, Russi L, Schulze S, Tardin MC, VanHee F, van Kruijssen L, Wilkins P, Willner E, Wolters L, Boller B (2010) Susceptibility of European cultivars of Italian and perennial ryegrass to crown and stem rust. *Euphytica* 176:167–181.
- Schubiger FX, Boller B (2015) Virulence of crown rust isolates (*Puccinia coronata* f.sp. *lolii*) on genotypes of Italian and perennial ryegrass (*Lolium multiflorum* and *L. perenne*). *Eur J Plant Pathol* 144:141–154.
- Schubiger FX, Streckeisen P, Boller B (2006) The EUCARPIA Multisite Rust Evaluation – Results of the trials 2004. In: *Breeding and seed production for conventional and organic agriculture—XXVI EUCARPIA Fodder Crops and Amenity Grasses Section Meeting in Perugia, Italy*. pp 154–158
- Serfling A, Templer SE, Winter P, Ordon F (2016) Microscopic and Molecular Characterization of the Prehaustorial Resistance against Wheat Leaf Rust (*Puccinia triticina*) in Einkorn (*Triticum monococcum*). *Front Plant Sci* 7:1–18.
- Shimada T, Fuji K, Tamura K, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2003) Vacuolar sorting receptor for seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:16095–16100.
- Sillero JC, Rubiales D (2002) Histological Characterization of Resistance to *Uromyces viciae-fabae* in Faba Bean. *Phytopathology* 92:294–9.
- Sim S, Diesburg K, Casler M, Jung G (2007) Mapping and comparative analysis of QTL for crown rust resistance in an Italian x perennial ryegrass population. *Phytopathology* 97:767–776.
- Singh P, Kuo Y-C, Mishra S, Tsai C-H, Chien C-C, Chen C-W, Desclos-Theveniau M, Chu P-W, Schulze B, Chinchilla D, Boller T, Zimmerli L (2012) The Lectin Receptor Kinase-VI.2 Is Required for Priming and Positively Regulates *Arabidopsis* Pattern-Triggered Immunity. *Plant Cell* 24:1256–1270.
- Singh P, Zimmerli L (2013) Lectin receptor kinases in plant innate immunity. *Front Plant Sci* 4:124.

- Skovmand B, Wilcoxson RD, Shearer BL, Stucker RE (1978) Inheritance of slow rusting to stem rust in wheat. *Euphytica* 27:95–107.
- Smit HJ, Tas BM, Taweel HZ, Tamminga S, Elgersma A (2005) Effects of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars on herbage production, nutritional quality and herbage intake of grazing dairy cows. *Grass Forage Sci* 60:297–309.
- Song J, Bradeen JM, Naess SK, Raasch J A, Wielgus SM, Haberlach GT, Liu J, Kuang H, Austin-Phillips S, Buell CR, Helgeson JP, Jiang J (2003) Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9128–9133.
- Struck C (1996) Plasma Membrane H⁺-ATPase Activity in Spores, Germ Tubes, and Haustoria of the Rust Fungus *Uromyces viciae-fabae*. *Fungal Genet Biol* 20:30–35.
- Studer B, Boller B, Bauer E, Posselt UK, Widmer F, Kölliker R (2007) Consistent detection of QTLs for crown rust resistance in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) across environments and phenotyping methods. *Theor Appl Genet* 115:9–17.
- Svensson B, Svendsen I, Højrup P, Roepstorff P, Ludvigsen S, Poulsen FM (1992) Primary structure of barwin: a barley seed protein closely related to the C-terminal domain of proteins encoded by wound-induced plant genes. *Biochemistry* 31:8767–8770.
- Takahashi S, Yeo Y-S, Zhao Y, O'Maille PE, Greenhagen BT, Noel JP, Coates RM, Chappell J (2007) Functional characterization of prenaspirodiene oxygenase, a cytochrome P450 catalyzing regio- and stereo-specific hydroxylations of diverse sesquiterpene substrates. *J Biol Chem* 282:31744–54.
- Theis T, Stahl U (2004) Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cell Mol Life Sci* 61:437–455.
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J* 11:1187–1194.
- Tiburzy R, Noll U, Reisener HJ (1990) Resistance of wheat to *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*: Histological investigation of resistance caused by the *Sr5* gene. *Physiol Mol Plant Pathol* 36:95–108.
- Torto-Alalibo T, Collmer CW, Gwinn-Giglio M (2009) The Plant-Associated Microbe Gene Ontology (PAMGO) Consortium: community development of new Gene Ontology terms describing biological processes involved in microbe-host interactions. *BMC Microbiol* 9 Suppl 1:S1.
- van der Vossen E, Sikkema A, Hekkert BTL, Gros J, Stevens P, Muskens M, Wouters D, Pereira A, Stiekema W, Allefs S (2003) An ancient R gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *Plant J* 36:867–882.

- Vargas WA, Martín JMS, Rech GE, Rivera LP, Benito EP, Díaz-Mínguez JM, Thon MR, Sukno S a (2012) Plant defense mechanisms are activated during biotrophic and necrotrophic development of *Colletotricum graminicola* in maize. *Plant Physiol* 158:1342–1358.
- Voegele RT, Mendgen K (2003) Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. *New Phytol* 159:93–100.
- Voegele RT, Struck C, Hahn M, Mendgen K (2001) The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8133–8.
- Wang CF, Huang LL, Buchenauer H, Han QM, Zhang HC, Kang ZS (2007) Histochemical studies on the accumulation of reactive oxygen species (O₂- and H₂O₂) in the incompatible and compatible interaction of wheat-*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Physiol Mol Plant Pathol* 71:230–239.
- Wang L (2011) Biological funktions of *Arabidopsis TGA1* and *TGA4* transcription factors. University of Saskatchewan.
- Wang L, Feng Z, Wang X, Wang X, Zhang X (2010) DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics* 26:136–138.
- Wang X-M, Gaudet DA, Liu W, Frick M, Puchalski B, Lu Z-X, Leggett F, Kang Z-S, Laroche A (2014a) Defence responses including hypersensitive cell death, oxidative burst and defence gene expression in “Moro” wheat inoculated with *Puccinia striiformis*. *Can J Plant Pathol* 36:202–215.
- Wang Y, Kwon SJ, Wu J, Choi J, Lee Y, Agrawal GK, Tamogami S, Rakwal R, Park S, Kim B-G, Jung K, Kang KY, Kim SG, Kim ST (2014b) Transcriptome Analysis of Early Responsive Genes in Rice during *Magnaporthe oryzae* Infection. *Plant Pathol J* 30:343–354.
- Welty RE, Barker RE (1992) Evaluation of resistance to stem rust in perennial ryegrass grown in controlled and field conditions. *Plant Dis* 76:637–641.
- Whitham SA, Quan S, Chang HS, Cooper B, Estes B, Zhu T, Wang X, Hou YM (2003) Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J* 33:271–283.
- Wilcoxson RD (1981) Genetics of Slow Rusting in Cereals. *Phytopathology* 71:989.
- Wilkins PW (1991) Breeding perennial ryegrass for agriculture. *Euphytica* 52:201–214.
- Wisser RJ, Kolkman JM, Patzoldt ME, Holland JB, Yu J, Krakowsky M, Nelson RJ, Balint-Kurti PJ (2011) Multivariate analysis of maize disease resistances suggests a pleiotropic genetic basis and implicates a GST gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:7339–7344.
- Xu P, Xu S-L, Li Z-J, Tang W, Burlingame AL, Wang Z-Y (2014) A Brassinosteroid-Signaling Kinase Interacts with Multiple Receptor-Like Kinases in *Arabidopsis*. *Mol Plant* 7:441–444.
- Yang P, Perovic D, Habekuß A, Zhou R, Graner A, Ordon F, Stein N (2013) Gene-based high-density mapping of the gene *rym7* conferring resistance to Barley mild mosaic virus (BaMMV). *Mol Breed* 32:27–37.

- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics 13:134.
- Zawada AM, Rogacev KS, Müller S, Rotter B, Winter P, Fliser D, Heine GH (2014) Massive analysis of cDNA Ends (MACE) and miRNA expression profiling identifies proatherogenic pathways in chronic kidney disease. Epigenetics 9:161–72.
- Zhang H, Hu Y, Wang C, Ji W (2011a) Gene Expression in Wheat Induced by Inoculation with *Puccinia striiformis* West. Plant Mol Biol Report 29:458–465.
- Zhang H, Wang C, Cheng Y, Chen X, Han Q, Huang L, Wei G, Kang Z (2012) Histological and cytological characterization of adult plant resistance to wheat stripe rust. Plant Cell Rep 31:2121–2137.
- Zhang H, Wang C, Cheng Y, Wang X, Li F, Han Q, Xu J, Chen X, Huang L, Wei G, Kang Z (2011b) Histological and molecular studies of the non-host interaction between wheat and *Uromyces fabae*. Planta 234:979–991.

Anhang

A1 SNP und ETR Primersequenzen der genetischen Kartierung von *LpPg1*

Marker name	Gen ID	Orientierung	Sequenz (5'-3')
<i>LpETR_1</i>	LoliumRes_a48290_26	F	GTTCAGAACAGATGCATGTACG
		R	AGACGAGAGTTGGAAGCACC
<i>LpETR_2</i>	LoliumRes_a97885_41	F	GCCAAAGAGATGGACGTGGA
		R	CGGAGGACGAAGAATCGGG
<i>LpETR_3</i>	LoliumRes_a37859_64	F	GAACAATTTGCGTGCGTGTG
		R	GCAGCTTCAGTGCTTCTTCA
<i>LpETR_4</i>	LoliumRes_a808308_4	F	CCTGCACACTGAGCTCTACC
		R	AGCCTGATACACCTTGGGGA
<i>LpETR_5</i>	LoliumRes_a48100_26	F	CCGGCAACGTTTCAATGTGT
		R	TGCTTGGGTTTTCTGTGGGT
<i>LpETR_6</i>	LoliumRes_a1119992_2	F	GAGGTAGCAATCCTCTCGCA
		R	CAGTCATCCCAGCACAGACA
<i>LpETR_7</i>	LoliumRes_a258364_10	F	GGTGCGCAGTAGACTCTTGT
		R	GGAAGAAAGGCCGACCATGA
<i>LpETR_8</i>	LoliumRes_a371696_4	F	CGGGGCGGATCTTGATTTCT
		R	CCTGGTTCTGTCTAGCGTGG
<i>LpETR_9</i>	LoliumRes_a805910_3	F	TCTTCCTTCGCTTGACACCC
		R	GTGTCGTGGCAGACCATAACA
<i>LpETR_10</i>	LoliumRes_a667642_4	F	AACGCCGAAGCAGACCTAAA
		R	TGGACGGCGAATTCAGAGAC
<i>LpETR_11</i>	LoliumRes_a694160_4	F	ACAGTCGATCAACCTGGAGC
		R	GAGACCACTCCTTGCTGCAT
<i>LpETR_12</i>	LoliumRes_a80742_14	F	ATGCAGTTGGGCAAGCAAAG
		R	AGTACGACCGATGAACCAGC
<i>LpETR_13</i>	LoliumRes_a284261_12	F	GTAAAGTTGGCTGTGCGCTG
		R	CTCTTGATCTCACGGGCACA
<i>LpETR_14</i>	LoliumRes_a366934_6	F	CACCCTGGATATGACTCGCC
		R	GTAGTGCACCCACTGATGCT
<i>LpETR_15</i>	LoliumRes_a311035_7	F	TTGATCCTGCACGCATCCTT
		R	ACGCAATTCGTAGGCAGTCA
<i>LpETR_16</i>	LoliumRes_a330668_9	F	ACGGGAGTTAAAGAGCTGCC
		R	ATGGCCAACTTCCTAAGCCC
<i>LpETR_17</i>	LoliumRes_a924483_3	F	AACTGCCTGTTTTGGCTCA
		R	ACGGACCCTGATGTAGTCCT
<i>LpETR_18</i>	LoliumRes_a783434_3	F	CTTGACTCCTGTCCGCATGA
		R	CTTTGGAAAAGCCAGGCAGT
<i>LpETR_19</i>	LoliumRes_a549699_4	F	AAGGTTGAGCTGCTGAGGAC
		R	ACACATCCACCCATGCTCTG
<i>LpETR_20</i>	LoliumRes_a251630_12	F	GCAGCCTTGAGTAAGCTCGT
		R	CGAAGTTAATCCCCCAGGCA

<i>LpETR_21</i>	LoliumRes_a606663_4	F	AAGTTGGGGTGTTGGGACAA
		R	GTAAGTCACCTGGCACACCA
<i>LpETR_22</i>	LoliumRes_a919816_3	F	AGCGACCTTTTAGACACCCA
		R	ACATGCTGCTTAGCCTCTGA
<i>LpETR_23</i>	LoliumRes_a903709_3	F	GAGAACGCGAAGACGAGGTA
		R	CCCTAACGGACGGTCGC
<i>LpETR_24</i>	LoliumRes_a468036_6	F	TCTCCTTGCTGGCGTTC
		R	GAGGATGTGGTTCTCGGCG
<i>LpETR_25</i>	LoliumRes_a118799_14	F	CAGCCTATCCATTCCCCACC
		R	CCCAGTCACCCAGATGCAAA
<i>LpETR_26</i>	LoliumRes_a281285_14	F	TTGCCACCACTAGAACATGGC
		R	AAGGGATTTTAGCCGAGTGC
<i>LpETR_27</i>	LoliumRes_a161855_16	F	TACGAGGGAATCGGGGGAAT
		R	GCCAGCGGATAACAGGAACT
<i>LpSNP_1</i>	LoliumRes_a22046_111	F	ATGAAGCCACGACTTCCAGG
		R	TTGTGTGCCCCGATTGTCAGA
<i>LpSNP_2</i>	LoliumRes_a45803_46	F	AGACGCCGCCATGCTG
		R	ACAGTACGTACCGACTGACT
<i>LpSNP_3</i>	LoliumRes_a56760_30	F	GACGTCCAACCTGTGTATAGT
		R	AGACCTGTACAACACATGCAGA

A2 Auszählungen zur Entwicklung der Kronenrostinfektionsstrukturen in kronenrostresistenten und -anfälligen *Lolium perenne*-Genotypen

Entwicklung der Rostinfektionsstrukturen	Zeitpunkt	VRG	RE	MRG	AG	Aurora
Keimfähigkeit (in %)	6 hpi	83,4 ± 9,4	67,8 ± 11,6	80,0 ± 10,8	80,5 ± 15,6	80,8 ± 14,7
	12 hpi	87,0 ± 8,8 ^a	74,6 ± 13,2 ^b	87,4 ± 7,1 ^a	81,8 ± 20,9 ^a	70,6 ± 14,7 ^b
Appressorienbildung (in %)	6 hpi	45,9 ± 11,0 ^b	46,5 ± 19,4 ^b	46,9 ± 10,0 ^b	61,1 ± 20,7 ^a	63,5 ± 19,7 ^a
	12 hpi	59,9 ± 16,5 ^b	66,7 ± 20,4 ^b	62,5 ± 10,7 ^b	77,8 ± 13,9 ^b	75,1 ± 16,7 ^b
Penetrationserfolg der Appressorien/ Anteil gebildeter substomatärer Viskel aus Appressorien (in %)	12 hpi	39,0 ± 23,2 ^b	56,6 ± 19,4 ^{ab}	64,0 ± 16,0 ^a	62,2 ± 14,8 ^a	71,6 ± 12,3 ^a
	24 hpi	75,2 ± 15,0 ^d	85,5 ± 9,6 ^b	87,2 ± 6,8 ^c	90,6 ± 5,1 ^b	94,4 ± 4,6 ^a
	36 hpi	67,6 ± 22,2	84,7 ± 7,6	81,6 ± 6,7	86,0 ± 22,8	91,7 ± 7,9
	48 hpi	72,0 ± 22,1	93,0 ± 7,4	84,1 ± 7,0	88,2 ± 5,3	93,6 ± 5,4
	60 hpi	64,4 ± 22,3	89,9 ± 6,0	77,9 ± 8,5	83,0 ± 11,5	90,8 ± 5,3
Anteil Infektionshyphen aus substomatalen Vesikeln (in %)	12 hpi	66,8 ± 25,3	55,4 ± 15,6	67,2 ± 10,6	62,4 ± 16,8	70,5 ± 11,7
	24 hpi	95,7 ± 6,0 ^b	99,5 ± 1,1 ^a	94,9 ± 5,1 ^b	99,1 ± 2,0 ^a	99,8 ± 0,7 ^a
	36 hpi	99,8 ± 0,8	99,2 ± 1,9	99,5 ± 1,0	97,8 ± 7,0	100,0 ± 0,0
	48 hpi	99,1 ± 1,9	99,8 ± 0,7	98,9 ± 2,1	98,8 ± 3,0	100,0 ± 0,0
	60 hpi	98,0 ± 3,2	99,8 ± 0,7	94,7 ± 13,1	98,3 ± 2,4	99,5 ± 1,0
Mittelwert der gebildeten Haustorienmutterzellen je substomatärem Vesikeln	12 hpi	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	24 hpi	1,5 ± 0,2 ^{b, A}	1,6 ± 0,1 ^{ab, A}	1,5 ± 0,1 ^{b, A}	1,6 ± 0,1 ^{b, A}	1,8 ± 0,1 ^{a, A}
	36 hpi	1,9 ± 0,1 ^{c, B}	2,3 ± 0,3 ^{a, B}	2,1 ± 0,2 ^{bc, B}	2,2 ± 0,2 ^{ab, B}	2,3 ± 0,2 ^{a, B}
	48 hpi	2,2 ± 0,2 ^{d, C}	2,5 ± 0,3 ^{c, B}	2,7 ± 0,2 ^{b, C}	3,5 ± 0,5 ^{a, C}	3,6 ± 0,6 ^{a, C}
	60 hpi	1,9 ± 0,2 ^{d, B}	2,5 ± 0,3 ^{c, B}	3,0 ± 0,4 ^{b, D}	6,6 ± 1,3 ^{a, D}	6,8 ± 2,5 ^{a, D}

kleine Buchstaben zeigen Signifikanz für $p < 0,05$ zwischen den Genotypen innerhalb eines Zeitpunkts

große Buchstaben zeigen Signifikanz für $p < 0,05$ zwischen den Zeitpunkten innerhalb eines Genotyps

A3 „Gene Ontology“ signifikant überexprimierter Transkripte in den kronenrostresistenten und -anfälligen *Lolium perenne*-Genotypen

goterm	Beschreibung	log2FC		
		vollständig resistent	resistenter Elter	moderat resistent
GO:1901668	regulation of superoxide dismutase activity	exklusiv	exklusiv	exklusiv
GO:1901671	positive regulation of superoxide dismutase activity	exklusiv	exklusiv	exklusiv
GO:0006995	cellular response to nitrogen starvation	3,3	exklusiv	
GO:0009626	plant-type hypersensitive response	2,3	2,8	
GO:0034050	host programmed cell death induced by symbiont	2,3	2,8	
GO:0043562	cellular response to nitrogen levels	2,3	exklusiv	
GO:1901804	beta-glucoside metabolic process	2,3	exklusiv	
GO:1901806	beta-glucoside biosynthetic process	2,3	exklusiv	
GO:0010132	dhurrin biosynthetic process	2,3	exklusiv	
GO:0012501	programmed cell death	2,1	2,8	
GO:0042435	indole-containing compound biosynthetic process	2,9		2,0
GO:0000162	tryptophan biosynthetic process	2,3		2,2
GO:0046219	indolalkylamine biosynthetic process	2,3		2,2
GO:0009830	cell wall modification involved in abscission	2,0		2,0
GO:0044277	cell wall disassembly	2,0		2,0
GO:0044000	movement in host	exklusiv		
GO:0046739	spread of virus in multicellular host	exklusiv		
GO:0046740	spread of virus in host, cell to cell	exklusiv		
GO:0048832	specification of organ number	exklusiv		
GO:0048833	specification of floral organ number	exklusiv		
GO:0051814	movement in other organism involved in symbiotic interaction	exklusiv		
GO:0080009	mRNA methylation	exklusiv		
GO:0097167	circadian regulation of translation	exklusiv		
GO:0010363	regulation of plant-type hypersensitive response	3,6		
GO:0042430	indole-containing compound metabolic process	3,0		
GO:0045088	regulation of innate immune response	2,8		
GO:0009696	salicylic acid metabolic process	2,7		
GO:0009697	salicylic acid biosynthetic process	2,7		
GO:0002682	regulation of immune system process	2,7		
GO:0006568	tryptophan metabolic process	2,6		
GO:0006586	indolalkylamine metabolic process	2,6		
GO:0006612	protein targeting to membrane	2,4		
GO:0072657	protein localization to membrane	2,4		
GO:0090150	establishment of protein localization to membrane	2,4		
GO:0008037	cell recognition	2,4		
GO:0048544	recognition of pollen	2,4		
GO:0009073	aromatic amino acid family biosynthetic process	2,3		

GO:0016137	glycoside metabolic process	2,3
GO:0016138	glycoside biosynthetic process	2,3
GO:0019756	cyanogenic glycoside biosynthetic process	2,3
GO:0042341	cyanogenic glycoside metabolic process	2,3
GO:0042991	transcription factor import into nucleus	2,3
GO:0050898	nitrile metabolic process	2,3
GO:0080028	nitrile biosynthetic process	2,3
GO:1901642	nucleoside transmembrane transport	2,3
GO:1902358	sulfate transmembrane transport	2,3
GO:0009875	pollen-pistil interaction	2,2
GO:0009627	systemic acquired resistance	2,2
GO:0008219	cell death	2,1
GO:0016265	death	2,1
GO:0052126	movement in host environment	2,0
GO:0052192	movement in environment of other organism involved in symbiotic interaction	2,0
<hr/>		
GO:0000209	protein polyubiquitination	exklusiv
GO:0000255	allantoin metabolic process	exklusiv
GO:0000256	allantoin catabolic process	exklusiv
GO:0009410	response to xenobiotic stimulus	exklusiv
GO:0010135	ureide metabolic process	exklusiv
GO:0010136	ureide catabolic process	exklusiv
GO:0010163	high-affinity potassium ion import	exklusiv
GO:0010440	stomatal lineage progression	exklusiv
GO:0010769	regulation of cell morphogenesis involved in differentiation	exklusiv
GO:0015837	amine transport	exklusiv
GO:0032890	regulation of organic acid transport	exklusiv
GO:0032973	amino acid export	exklusiv
GO:0043157	response to cation stress	exklusiv
GO:0043266	regulation of potassium ion transport	exklusiv
GO:0043270	positive regulation of ion transport	exklusiv
GO:0044210	'de novo' CTP biosynthetic process	exklusiv
GO:0051353	positive regulation of oxidoreductase activity	exklusiv
GO:0051952	regulation of amine transport	exklusiv
GO:0051955	regulation of amino acid transport	exklusiv
GO:0060284	regulation of cell development	exklusiv
GO:0080027	response to herbivore	exklusiv
GO:0080092	regulation of pollen tube growth	exklusiv
GO:0080143	regulation of amino acid export	exklusiv
GO:0009267	cellular response to starvation	4,0
GO:0031669	cellular response to nutrient levels	4,0
GO:0042594	response to starvation	4,0
GO:0045454	cell redox homeostasis	4,0

GO:0009991	response to extracellular stimulus	3,3	
GO:0031668	cellular response to extracellular stimulus	3,3	
GO:0071496	cellular response to external stimulus	3,3	
GO:0052386	cell wall thickening	2,6	
GO:0052543	callose deposition in cell wall	2,6	
GO:0006260	DNA replication	2,4	
GO:0015074	DNA integration	2,3	
GO:0090305	nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis	2,3	
GO:0006259	DNA metabolic process	2,2	
GO:0006278	RNA-dependent DNA replication	2,2	
GO:0006508	proteolysis	2,0	
GO:0031407	oxylipin metabolic process	2,0	
GO:0031408	oxylipin biosynthetic process	2,0	
GO:0019408	dolichol biosynthetic process		exklusiv
GO:0019348	dolichol metabolic process		exklusiv
GO:0033386	geranylgeranyl diphosphate biosynthetic process		exklusiv
GO:0006148	inosine catabolic process		exklusiv
GO:0046102	inosine metabolic process		exklusiv
GO:0080037	negative regulation of cytokinin mediated signaling pathway		exklusiv
GO:0016094	polyprenol biosynthetic process		exklusiv
GO:0016093	polyprenol metabolic process		exklusiv

A4 „Gene Ontology“ signifikant überexprimierter Transkripte in den kronenrostinokulierten *Lolium perenne*-Genotypen im Vergleich zum nicht inokulierten Zeitpunkt

goterm	description	VRG	6 hpi			AG	VRG	12 hpi			AG	VRG	24 hpi			AG
			RE	MRG				RE	MRG				RE	MRG		
GO:0002181	cytoplasmic translation	exklusiv	exklusiv	exklusiv	exklusiv		exklusiv	exklusiv	exklusiv	exklusiv		exklusiv	exklusiv	exklusiv	exklusiv	
GO:0006559	L-phenylalanine catabolic process	exklusiv							exklusiv			exklusiv				
GO:0009800	cinnamic acid biosynthetic process	exklusiv		exklusiv					exklusiv			exklusiv		exklusiv		
GO:0009803	cinnamic acid metabolic process	exklusiv		exklusiv					exklusiv			exklusiv		exklusiv		
GO:1902222	erythrose 4-phosphate/phosphoenolpyruvate family amino acid catabolic process	exklusiv							exklusiv			exklusiv				
GO:0022413	reproductive process in single-celled organism											exklusiv				
GO:0030435	sporulation resulting in formation of a cellular spore											exklusiv				
GO:0032505	reproduction of a single-celled organism											exklusiv				
GO:0043934	sporulation											exklusiv				
GO:0042775	mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport							5,0				5,1				
GO:0006122	mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c											4,3	4,5			
GO:0042255	ribosome assembly											4,2				exklusiv
GO:0006995	cellular response to nitrogen starvation		4,3	3,5	exklusiv					4,9		4,1		2,9		
GO:0043562	cellular response to nitrogen levels		4,3	3,5	exklusiv					4,9		4,1		2,9		
GO:0042274	ribosomal small subunit biogenesis		4,8	exklusiv				3,5				4,0	4,2			5,4
GO:1901071	glucosamine-containing compound metabolic process	3,5	5,6		4,9					3,8		3,5				4,0
GO:0006030	chitin metabolic process	3,5	5,5		4,8		4,0	2,8		3,8		3,4				4,0
GO:0046348	amino sugar catabolic process	3,3	5,4							3,7		3,3				3,8
GO:1901072	glucosamine-containing compound catabolic process	3,3	5,4							3,7		3,3				3,8
GO:0006026	aminoglycan catabolic process	3,3	5,4							3,7		3,2				
GO:0006032	chitin catabolic process	3,3	5,4							3,7		3,2				

GO:0006558	L-phenylalanine metabolic process	3,1	3,2						3,1			
GO:1902221	erythrose 4-phosphate/phosphoenolpyruvate family amino acid metabolic process	3,1	3,2						3,1			
GO:0006022	aminoglycan metabolic process	3,1	4,5	3,8	3,5	2,5		3,4	3,1			3,6
GO:0009060	aerobic respiration			3,0	2,1	2,8	3,4	3,0	2,9	3,1	2,3	3,3
GO:0006099	tricarboxylic acid cycle			2,4		2,4	2,9	2,7	2,8	3,0	2,3	2,9
GO:0042773	ATP synthesis coupled electron transport					2,8			2,7			
GO:0045333	cellular respiration			2,8		2,5	2,7	2,6	2,5	3,0	2,3	3,2
GO:0006730	one-carbon metabolic process	2,2			2,3				2,5			
GO:0032543	mitochondrial translation								2,4		2,0	
GO:0015980	energy derivation by oxidation of organic compounds			2,5		2,3	2,5	2,3	2,3	2,7	2,1	3,1
GO:0022904	respiratory electron transport chain					2,2			2,2			3,4
GO:0045730	respiratory burst	4,7	5,0	4,7		6,1		4,9				
GO:0006040	amino sugar metabolic process	3,3						3,5				
GO:0071826	ribonucleoprotein complex subunit organization	3,1		4,3								6,1
GO:0000746	conjugation	2,5	2,1	3,8	2,0							
GO:0006560	proline metabolic process	2,2										
GO:0000747	conjugation with cellular fusion			exklusiv								
GO:0002679	respiratory burst involved in defense response		4,9	4,6		6,0		4,8				
GO:0006119	oxidative phosphorylation					2,8						
GO:0006412	translation		2,1379			2,1				2,6		2,5
GO:0006414	translational elongation									2,2		
GO:0006820	anion transport			2,1		2,1				2,1		
GO:0007005	mitochondrion organization									3,2		
GO:0007264	small GTPase mediated signal transduction					3,1						
GO:0008037	cell recognition			4,4								
GO:0008104	protein localization					2,0						2,3
GO:0009404	toxin metabolic process					2,9						
GO:0009407	toxin catabolic process					2,8						
GO:0009620	response to fungus			2,0								
GO:0009627	systemic acquired resistance			2,0								
GO:0009696	salicylic acid metabolic process		2,2									
GO:0009697	salicylic acid biosynthetic process		2,1									

GO:0009698	phenylpropanoid metabolic process	2,2	2,3						
GO:0010200	response to chitin	2,1							
GO:0010583	response to cyclopentenone		2,2		2,8				
GO:0015031	protein transport				2,0				
GO:0015749	monosaccharide transport								exklusiv
GO:0015791	polyol transport								2,1
GO:0016192	vesicle-mediated transport				3,7		3,1	2,6	3,8
GO:0016998	cell wall macromolecule catabolic process	4,2		3,4			3,3		
GO:0018958	phenol-containing compound metabolic process	2,3	2,0						
GO:0019673	GDP-mannose metabolic process					2,2			
GO:0022618	ribonucleoprotein complex assembly		4,3						6,1
GO:0032011	ARF protein signal transduction				3,3				
GO:0032012	regulation of ARF protein signal transduction				3,3				
GO:0035556	intracellular signal transduction	2,1	2,3						
GO:0042537	benzene-containing compound metabolic process	2,5	2,1		2,2				
GO:0043069	negative regulation of programmed cell death	3,3	3,6				3,7		
GO:0043090	amino acid import		3,4						3,8
GO:0043434	response to peptide hormone							2,1	
GO:0045184	establishment of protein localization				2,0				
GO:0046189	phenol-containing compound biosynthetic process	2,2							
GO:0046487	glyoxylate metabolic process		2,2						
GO:0046686	response to cadmium ion								2,1
GO:0046907	intracellular transport				2,1				
GO:0048544	recognition of pollen		4,4						
GO:0050832	defense response to fungus		2,1						
GO:0060416	response to growth hormone							2,1	
GO:0060548	negative regulation of cell death	3,4	3,7				3,8		
GO:0071277	cellular response to calcium ion					2,6			
GO:0071702	organic substance transport								2,1
GO:0090487	secondary metabolite catabolic process				2,8				
GO:1901652	response to peptide							2,1	

GO:1902582 single-organism intracellular
transport

2,2

A5 Signifikant überexprimierte Transkripte in den kronenrostinokulierten *Lolium perenne*-Genotypen 6, 12 und 24 Stunden nach Inokulation

gene_id	description	VRG			RE			MRG			AG		
		6 hpi	12 hpi	24 hpi	6 hpi	12 hpi	24 hpi	6 hpi	12 hpi	24 hpi	6 hpi	12 hpi	24 hpi
Abwehr- und Stress induzierte Transkripte													
comp162236_c0_seq3	(+)-neomenthol dehydrogenase (<i>Capsicum annuum</i>)			exklusiv						exklusiv			
LoliumSus_a993635_3	(+)-neomenthol dehydrogenase (<i>Capsicum annuum</i>)									3,7			
Contig14075	Acidic endochitinase P (<i>Nicotiana tabacum</i>)				4,1	3,5						4,4	4,2
comp150396_c0_seq1	Alpha-amylase/trypsin inhibitor (<i>Z. mays</i>)			3,8				3,0	2,6	5,3			
comp122934_c0_seq3	Barwin (<i>H. vulgare</i>)	2,3	3,2	4,0		4,8	4,8	3,2	3,2	4,3		exklusiv	exklusiv
LoliumRes_a1192_855	Barwin (<i>H. vulgare</i>)		2,8	3,4	2,3	4,7	4,8	3,4	2,8	3,9	2,2	6,0	6,3
LoliumSus_a1803_818	Barwin (<i>H. vulgare</i>)		2,8	3,4	2,4	4,8	4,9	3,4	2,8	3,9		5,7	6,1
comp173676_c0_seq11	Basic endochitinase C (<i>S. cereale</i>)									2,5			
comp128715_c0_seq1	Chitinase 2 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)			3,2				4,6		6,0			
comp173676_c0_seq12	Chitinase 2 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)					2,8							
comp173676_c0_seq14	Chitinase 2 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)									4,2			exklusiv
comp173676_c0_seq2	Chitinase 2 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)					3,2						3,6	
comp173676_c0_seq3	Chitinase 2 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)			exklusiv						2,3			
comp173676_c0_seq8	Chitinase 2 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)					3,5						exklusiv	

LoliumRes_a1845_853	Chitinase 3 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)	3,1	2,8	4,6	2,8	5,8	5,5	3,3		3,9		6,8	7,1
comp184005_c0_seq1	Chitinase 5 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)				5,0	3,3		3,5		3,4	3,0	3,9	
Contig12050	Chitinase 5 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)					exklu siv	exklu siv						3,5
LoliumRes_a14950_116	Chitinase 5 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)	2,8	3,5		2,7	2,7						2,9	
LoliumRes_a9282_187	Chitinase 5 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)	3,1	3,9		3,4	3,2						3,2	2,5
LoliumRes_a9407_319	Chitinase 5 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)						exklu siv					3,6	4,3
LoliumRes_a46032_49	Chitinase 5 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)												exklu siv
comp172872_c0_seq1	Chitinase 6 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)				2,6			3,0		2,4		2,5	
comp172872_c0_seq3	Chitinase 6 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)				3,7							2,7	
comp172872_c0_seq6	Chitinase 6 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)	exklu siv	exklu siv	exklu siv	exklu siv	exklu siv							
LoliumRes_a33257_71	Chitinase 6 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)	2,6	2,2		3,2						2,0	2,5	
LoliumRes_a64473_32	Chitinase 6 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)	3,5	2,1	3,5	2,8	2,4	2,2					2,1	
LoliumRes_a55289_63	Chitinase 6 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)			exklu siv									
comp173676_c0_seq6	Chitinase) (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)			3,2			exklu siv	2,5		3,1			exklu siv
LoliumSus_a54747_38	Cinnamoyl-CoA reductase 2 (<i>A. thaliana</i>)	2,6	2,4	2,4		3,5	2,8				4,7	6,2	5,6
Contig2821	Cinnamyl alcohol dehydrogenase 7 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)	6,9	6,6	5,2	6,4	5,7	4,8	7,2	6,6	5,2	5,9	4,9	4,4
comp171641_c1_seq2	Cysteine proteinase inhibitor 8 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)				3,1								
LoliumRes_a48576_60	Cysteine proteinase inhibitor 8 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)								3,2			3,6	
LoliumRes_a13642_178	Cytochrome B5 isoform D (<i>A. thaliana</i>)	2,4	2,2	2,7		3,9	3,0					3,7	2,9
LoliumRes_a37381_44	Cytochrome b5 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)					2,3							
LoliumRes_a132178_27	Cytochrome P450 99A2 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)	3,5	3,6		5,6	4,2	2,5		2,3	2,0	4,6	6,5	4,0
LoliumRes_a179414_9	Cytochrome P450 99A2 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)	2,6					2,3					3,8	3,0

LoliumRes_a26 355_40	Cytochrome P450 99A2 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)	2,4	3,1			2,9		2,2		3,0	3,4
LoliumRes_a69 5594_3	Cytochrome P450 99A2 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)	2,3			3,0	2,2		3,2		4,0	3,1
LoliumSus_a13 5198_15	Cytochrome P450 99A2 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)	2,9		2,3	3,4	2,9		2,2		3,6	3,2
LoliumSus_a24 5229_10	Cytochrome P450 99A2 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)	4,0	4,3	2,1	5,3	4,2		2,2		5,1	7,4
comp158010_c 0_seq1	Defensin-like protein 1 (<i>A. thaliana</i>)						exkl siv	3,4			
LoliumRes_a17 6379_12	Disease resistance protein RGA2 (<i>S. bulbocastanum</i>)				3,2						
LoliumRes_a20 5266_10	Disease resistance protein RGA2 (<i>S. bulbocastanum</i>)				4,2	3,6	2,2			2,8	
LoliumRes_a34 745_50	Disease resistance protein RGA2 (<i>S. bulbocastanum</i>)		2,3								
LoliumRes_a64 121_21	Disease resistance protein RGA2 (<i>S. bulbocastanum</i>)	3,6	2,8	2,3	3,9	4,6	3,0	2,6	2,9	2,7	2,3
LoliumRes_a70 140_30	Disease resistance protein RGA2 (<i>S. bulbocastanum</i>)				3,6						
LoliumSus_a12 3467_18	Disease resistance protein RGA2 (<i>S. bulbocastanum</i>)			exkl siv				2,0			
LoliumSus_a18 5718_11	Disease resistance protein RGA2 (<i>S. bulbocastanum</i>)		exkl siv								
LoliumSus_a54 158_38	Disease resistance protein RGA2 (<i>S. bulbocastanum</i>)									2,3	
LoliumSus_a79 2_360	Disease resistance protein RPH8A (<i>A. thaliana</i>)						2,3				2,8
LoliumRes_a11 0584_16	Disease resistance protein RPM1 (<i>A. thaliana</i>)				2,4						
LoliumRes_a16 0151_12	Disease resistance protein RPM1 (<i>A. thaliana</i>)				exkl siv	3,1					
LoliumRes_a23 390_36	Disease resistance protein RPM1 (<i>A. thaliana</i>)	2,6	2,5		2,0	2,3				2,2	3,4
LoliumRes_a43 2270_6	Disease resistance protein RPM1 (<i>A. thaliana</i>)				exkl siv						2,8
LoliumRes_a49 106_19	Disease resistance protein RPM1 (<i>A. thaliana</i>)					2,4					
LoliumRes_a52 65_165	Disease resistance protein RPM1 (<i>A. thaliana</i>)		2,6								
LoliumSus_a25 150_57	Disease resistance protein RPM1 (<i>A. thaliana</i>)	2,3	2,2		2,8	2,8				2,9	

LoliumRes_a16 6216_12	Disease resistance protein RPM1 (<i>A. thaliana</i>)	3,3	3,1				2,5	2,2	2,1			
comp173707_c 1_seq14	Disease resistance protein RPM1 (<i>Triticum urartu</i>)				exklu siv							
LoliumRes_a19 7820_9	Disease resistance protein RPP13 (<i>A. thaliana</i>)				2,3							
LoliumRes_a25 362_26	Disease resistance protein RPP13 (<i>A. thaliana</i>)				2,1							
LoliumRes_a37 422_44	Disease resistance protein RPP13 (<i>A. thaliana</i>)					exklu siv	exklu siv				3,6	
LoliumSus_a21 184_35	Disease resistance protein RPP13 (<i>A. thaliana</i>)				2,9	2,7						
LoliumSus_a37 227_45	Disease resistance protein RPP13 (<i>A. thaliana</i>)						3,5					
LoliumSus_a45 910_22	Disease resistance protein RPP13 (<i>A. thaliana</i>)	2,9										
LoliumRes_a11 2802_12	Disease resistance protein RPS2 (<i>A. thaliana</i>)					4,0	2,4	2,7	2,0	2,2	3,5	2,1
LoliumSus_a63 220_22	Disease resistance protein RPS2 (<i>A. thaliana</i>)	2,1	2,3			2,6					2,8	3,9
LoliumSus_a65 114_16	Disease resistance protein RPS2 (<i>A. thaliana</i>)	2,1				2,4		2,5			3,7	2,2
LoliumRes_a11 357_126	Disease resistance response protein 206 (<i>Pisum sativum</i>)	2,4	4,4			4,7	4,0	2,4		2,4	4,1	3,0
LoliumRes_a38 602_59	Disease resistance response protein 206 (<i>Pisum sativum</i>)		3,5			2,2				2,5		
LoliumRes_a51 451_54	Disease resistance response protein 206 (<i>Pisum sativum</i>)	3,5	2,2	2,9							2,2	2,9
LoliumRes_a69 855_41	Disease resistance response protein 206 (<i>Pisum sativum</i>)	2,7	2,3	2,1	2,9	5,3	3,8	2,0	2,1		3,4	
LoliumRes_a46 707_24	Disease resistance RPP13-like protein 4 (<i>A. thaliana</i>)	2,7						2,0	2,5	2,6		2,4
LoliumRes_a10 47_723	Endochitinase A (<i>Z. mays</i>)		3,7		3,9	4,2	4,8	3,4		3,6	2,5	4,4
LoliumSus_a46 17_636	Endochitinase A (<i>Z. mays</i>)		2,2		2,8	3,9	3,9				2,9	3,8
comp172872_c 0_seq9	Endochitinase B (Fragment) (<i>Z. mays</i>)	2,6	3,1		2,8	3,8	3,5				3,2	3,8
LoliumRes_a15 270_95	Endochitinase B (Fragment) (<i>Z. mays</i>)	2,8	4,4		6,8	4,0	2,3				2,8	3,8
LoliumRes_a38 318_66	Endochitinase (<i>C. papaya</i>)										3,2	

LoliumRes_a14 6588_13	Ent-copalyl diphosphate synthase 2 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>indica</i>)	3,7	4,7	4,6	4,5	7,8	5,1		2,3	3,2	3,9	7,2	4,6
LoliumSus_a12 1200_19	Ent-copalyl diphosphate synthase 2 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>indica</i>)	3,4	4,2	4,0	3,1	6,4	3,5	2,2	2,5	3,5	4,3	7,4	4,2
LoliumRes_a52 16_338	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 13 (<i>A. thaliana</i>)									2,2			
LoliumSus_a61 412_39	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 8 (<i>A. thaliana</i>)				2,0	2,2							
LoliumRes_a44 53_490	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GII (<i>H. vulgare</i>)									exklu siv			
LoliumRes_a61 65_237	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GII (<i>H. vulgare</i>)	3,3	3,3	3,4									
LoliumSus_a99 04_168	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase (<i>T. aestivum</i>)				2,5	4,0	2,2	2,1				2,5	
LoliumRes_a79 29_167	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase (<i>T. aestivum</i>)				2,3	3,9	2,0	2,2				2,6	
comp115815_c 0_seq1	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic isoform (<i>Z. mays</i>)			4,1	3,4	4,8	3,7	2,7	2,1	3,3	2,6	4,7	5,6
comp115815_c 0_seq2	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic isoform (<i>Z. mays</i>)		2,1	3,9	3,7	5,3	3,9	2,8	2,1	3,4	3,0	5,8	6,4
comp132107_c 0_seq1	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic isoform (<i>Z. mays</i>)	2,3	2,1	4,5	2,6	4,2	4,9	3,6	3,2	4,4		3,3	5,3
LoliumRes_a13 4_2812	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic isoform (<i>Z. mays</i>)			2,9	4,0	4,2	5,4	2,1		3,1		4,2	6,3
LoliumRes_a16 067_223	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic isoform (<i>Z. mays</i>)									exklu siv			exklu siv
LoliumRes_a31 45_972	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic isoform (<i>Z. mays</i>)			4,4		exklu siv	exklu siv	4,2	3,6	4,6			exklu siv
LoliumRes_a56 32_317	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic isoform (<i>Z. mays</i>)		3,2	5,0		exklu siv		3,2	2,6	3,1			exklu siv
LoliumRes_a58 59_528	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic isoform (<i>Z. mays</i>)			4,0	4,6	5,9	4,2	3,1	2,6	3,6	4,3	6,4	7,1
LoliumRes_a70 7_2096	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic isoform (<i>Z. mays</i>)	2,3	2,2	4,6	3,5	5,4	5,8	4,0	3,2	4,5		4,6	6,2
LoliumSus_a62 11_410	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic isoform (<i>Z. mays</i>)									exklu siv			3,4
comp153855_c 1_seq7	Glutathione transferase GST 23 (<i>Z. mays</i>)				2,2			2,8					
Contig1287	Glutathione transferase GST 23 (<i>Z. mays</i>)	3,1	3,4	3,7		4,9	4,5					exklu siv	exklu siv
LoliumRes_a17 231_95	Glutathione transferase GST 23 (<i>Z. mays</i>)				2,4	3,8	3,8			2,0		2,3	2,7

LoliumRes_a29 433_56	Glutathione transferase GST 23 (<i>Z. mays</i>)	2,0	2,5		2,6	3,1					3,7	3,4	
LoliumRes_a81 85_242	Glutathione transferase GST 23 (<i>Z. mays</i>)	2,4		2,3	3,2	3,7	3,7	2,1		2,2	4,1	5,7	5,6
LoliumRes_a95 09_159	Glutathione transferase GST 23 (<i>Z. mays</i>)	2,8	2,6										
LoliumSus_a17 157_105	Glutathione transferase GST 23 (<i>Z. mays</i>)			2,1	3,4	4,6	5,0					2,5	2,8
LoliumSus_a55 538_47	Glutathione transferase GST 23 (<i>Z. mays</i>)			2,9		2,6	3,0	2,1		2,1		3,7	3,2
LoliumRes_a23 282_47	Heat shock 70 kDa protein 17 (<i>A. thaliana</i>)					2,3						2,4	
comp157442_c 1_seq1	Heat shock protein 81-1 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>indica</i>)				2,9	3,6	2,2		2,2			2,7	
LoliumRes_a53 44_415	Heat shock protein 81-1 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)		3,1						2,6			2,6	
LoliumRes_a59 2_1257	Heat shock protein 81-1 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)		2,6			2,1			2,4			2,5	
LoliumRes_a87 8_1537	Heat shock protein 81-1 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)		2,6		2,0	2,6			2,2			2,6	
comp168532_c 1_seq1	Heat shock protein 81-3 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)					3,2			2,4			3,0	
comp168532_c 1_seq2	Heat shock protein 81-3 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)		2,7			2,8			2,7			2,9	
comp168532_c 1_seq4	Heat shock protein 81-3 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)		2,7			3,0			2,1			2,6	
LoliumRes_a27 986_108	Heat shock protein 81-3 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)											exklu siv	
LoliumRes_a68 1_2094	Heat shock protein 81-3 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)		2,6			2,9			2,7			2,6	
LoliumSus_a31 068_103	Heat shock protein 81-3 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)								4,6				
LoliumSus_a35 6_2473	Heat shock protein 81-3 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)		2,1			2,8			2,6			2,7	
LoliumRes_a12 83_869	Heat shock protein 90-1 (<i>A. thaliana</i>)								3,2				
comp93201_c0 _seq1	Heat shock protein 90-2 (<i>A. thaliana</i>)				exklu siv		exklu siv	5,4				exklu siv	exklu siv
comp129730_c 0_seq2	Inositol-3-phosphate synthase isozyme 2 (<i>A. thaliana</i>)						exklu siv						
LoliumRes_a47 312_37	Major pollen allergen Aln g 1(<i>Alnus glutinosa</i>)	3,6	5,3	3,0	3,7	5,2	3,1	3,0	3,6	3,5	3,7	7,6	5,5

LoliumSus_a103345_21	Major pollen allergen Aln g 1 (<i>A. glutinosa</i>)	2,9	4,9	2,7	3,6	5,5	3,5	3,2	3,8	3,8	4,2	8,3	6,4
LoliumRes_a27219_42	Nematode resistance protein-like HSPRO2 (<i>A. thaliana</i>)				2,6	3,6					2,0	3,2	
comp102523_c0_seq1	Pathogenesis-related protein 1 (<i>H. vulgare</i>)									exklusiv			
comp167847_c4_seq8	Pathogenesis-related protein 1 (<i>A. officinalis</i>)		3,5		2,5								
LoliumRes_a13101_143	Pathogenesis-related protein 1 (<i>A. officinalis</i>)	2,8	2,8	4,4			2,7			2,7			2,1
LoliumRes_a16718_148	Pathogenesis-related protein 1 (<i>A. officinalis</i>)			4,1			2,8	3,4	3,6	4,3			
LoliumRes_a15391_110	Pathogenesis-related protein 1 (<i>H. vulgare</i>)			4,5		2,8	3,6				2,9	4,7	
LoliumRes_a30011_122	Pathogenesis-related protein 1 (<i>H. vulgare</i>)			exklusiv						5,2			
LoliumSus_a149148_14	Pathogenesis-related protein 1 (<i>H. vulgare</i>)			4,3			exklusiv	2,9	2,8	5,0			exklusiv
LoliumSus_a24893_122	Pathogenesis-related protein 1 (<i>H. vulgare</i>)	exklusiv	exklusiv	exklusiv		2,7	3,4						3,6
LoliumSus_a56245_64	Pathogenesis-related protein 1 (<i>H. vulgare</i>)						exklusiv			6,6			exklusiv
LoliumRes_a20608_82	Pathogenesis-related protein 10 (<i>H. vulgare</i>)	3,1	2,6		5,1	3,9	3,5	2,1			3,4	5,0	3,4
LoliumSus_a27769_81	Pathogenesis-related protein 10 (<i>H. vulgare</i>)	2,9	2,0		3,9	3,1	2,5				exklusiv	exklusiv	exklusiv
LoliumRes_a7210_241	Pathogenesis-related protein 4 (<i>T. monococcum</i>)			4,5		2,7	5,2			3,3		2,5	5,5
Contig1333	Pathogenesis-related protein 5 (<i>A. thaliana</i>)	5,2	5,6	4,0	5,4	5,5	4,4	6,0	6,3	5,1	5,3	4,7	4,9
comp122934_c0_seq1	Pathogenesis-related protein P2 (<i>Solanum lycopersicum</i>)		3,8	4,7		exklusiv	exklusiv	3,0	3,3	4,0		exklusiv	exklusiv
comp122934_c0_seq2	Pathogenesis-related protein P2 (<i>S. lycopersicum</i>)	2,9				exklusiv	exklusiv	3,5	3,3	4,1		exklusiv	exklusiv
comp171473_c1_seq1	Pathogenesis-related protein PRB1-3 (<i>H. vulgare</i>)						exklusiv	2,6	2,7	4,7			3,6
comp171473_c1_seq2	Pathogenesis-related protein PRB1-3 (<i>H. vulgare</i>)			5,3			3,1	2,5	2,6	4,8			3,7
comp171473_c1_seq7	Pathogenesis-related protein PRB1-3 (<i>H. vulgare</i>)						exklusiv	4,6		7,1			exklusiv
comp171473_c1_seq9	Pathogenesis-related protein PRB1-3 (<i>H. vulgare</i>)						exklusiv	4,9	4,5	7,2			4,0
LoliumRes_a44_5146	Pathogenesis-related protein PRB1-3 (<i>H. vulgare</i>)		2,4	4,0		4,4	5,5	2,3	2,2	2,5		4,9	6,2

comp171473_c1_seq5	Pathogenesis-related protein PRB1-3 (<i>H. vulgare</i>)						exklusiv			exklusiv			exklusiv
comp165814_c4_seq1	Pathogenesis-related protein STH-2 (<i>S. tuberosum</i>)	3,2	4,4	3,1	5,0	6,6	4,9	2,6	2,9	3,4	5,5	8,6	6,7
comp165814_c4_seq2	Pathogenesis-related protein STH-2 (<i>S. tuberosum</i>)	2,7	3,5	3,2					2,5	3,4			
comp165814_c4_seq3	Pathogenesis-related protein STH-2 (<i>S. tuberosum</i>)	2,8	4,1	2,7	5,4	7,1	5,5	3,2	3,4	3,8	3,6	6,8	4,9
comp165814_c4_seq4	Pathogenesis-related protein STH-2 (<i>S. tuberosum</i>)	3,1	3,9	3,5					2,5	3,2			
comp165814_c4_seq5	Pathogenesis-related protein STH-2 (<i>S. tuberosum</i>)	4,4	5,9	5,3					2,3	3,1			
comp165814_c4_seq6	Pathogenesis-related protein STH-2 (<i>S. tuberosum</i>)	3,3	4,4	3,1	5,4	7,2	5,5	2,8	3,0	3,5	4,2	7,2	5,1
LoliumRes_a2001_378	Pathogenesis-related protein STH-21 (<i>S. tuberosum</i>)	3,4	4,5	3,3	3,6	5,2	3,9	2,6	2,9	3,3	3,7	6,8	4,9
comp176334_c0_seq1	Pathogenesis-related protein STH-21 (<i>S. tuberosum</i>)									2,4			
comp123177_c0_seq1	Pathogen-related protein 10-3 (<i>L. perenne</i>)				exklusiv								
comp159354_c0_seq1	Pathogen-related protein 10-3 (<i>L. perenne</i>)				3,3								
comp159354_c0_seq3	Pathogen-related protein 10-3 (<i>L. perenne</i>)												2,3
comp159354_c0_seq6	Pathogen-related protein 10-3 (<i>L. perenne</i>)												2,1
LoliumRes_a11169_243	Pathogen-related protein (<i>H. vulgare</i>)											2,5	
LoliumRes_a22033_138	Pathogen-related protein (<i>H. vulgare</i>)										2,1	3,4	2,4
LoliumRes_a43695_98	Pathogen-related protein (<i>H. vulgare</i>)					4,0	4,2					exklusiv	exklusiv
LoliumSus_a13602_175	Pathogen-related protein (<i>H. vulgare</i>)											3,0	
LoliumSus_a39738_87	Pathogen-related protein (<i>H. vulgare</i>)				3,0	2,8							
LoliumRes_a94293_12	Probable disease resistance protein At1g58390 (<i>A. thaliana</i>)				3,4							3,2	2,1
LoliumRes_a73992_15	Probable disease resistance protein RDL5 (<i>A. thaliana</i>)					4,1	3,4						
LoliumRes_a167443_10	Probable disease resistance protein RXW24L (<i>A. thaliana</i>)											2,9	

[illegible]

LoliumRes_a12 1993_12	Putative disease resistance RPP13-like protein 1 (<i>A. thaliana</i>)	2,7	2,1	2,5								2,7	
LoliumRes_a49 66_64	Putative disease resistance RPP13-like protein 1 (<i>A. thaliana</i>)												2,2
LoliumSus_a12 0130_18	Putative disease resistance RPP13-like protein 1 (<i>A. thaliana</i>)				exklu siv	exklu siv		3,8	3,4			exklu siv	
LoliumRes_a54 6091_4	Putative disease resistance RPP13-like protein 3 (<i>A. thaliana</i>)							exklu siv					
LoliumRes_a97 26_93	Putative disease resistance RPP13-like protein 3 (<i>A. thaliana</i>)												2,2
LoliumSus_a12 2253_16	Putative disease resistance RPP13-like protein 3 (<i>A. thaliana</i>)											3,7	
LoliumSus_a12 9293_12	Putative disease resistance RPP13-like protein 3 (<i>A. thaliana</i>)										2,2	2,5	2,1
LoliumSus_a50 984_19	Putative disease resistance RPP13-like protein 3 (<i>A. thaliana</i>)	2,1			3,1	2,8	2,9				3,6	4,8	4,5
LoliumSus_a23 4749_10	Putative glucan endo-1,3-beta-glucosidase GVI (Fragment) (<i>H. vulgare</i>)						2,5						
LoliumRes_a63 307_17	Putative late blight resistance protein homolog R1A-6 (<i>S. demissum</i>)	2,5		2,1	2,0	2,5						3,3	2,2
LoliumRes_a73 6191_3	Resistance protein RGA2 (<i>Triticum urartu</i> var. <i>urartu</i>)							3,8	3,6				
LoliumRes_a15 7432_9	Reticuline oxidase-like protein (<i>A. thaliana</i>)	2,5	2,7	2,4									
LoliumRes_a30 151_42	Reticuline oxidase-like protein (<i>A. thaliana</i>)	2,4		4,6		4,5	6,9			3,8			3,1
Contig3636	Thaumatococcus-like pathogenesis-related protein 1 (<i>A. sativa</i>)	4,7	5,5	4,5	5,7	6,0	5,5	6,0	6,6	5,9	6,0	6,0	6,3
LoliumRes_a27 2_2592	Thaumatococcus-like pathogenesis-related protein 2 (<i>A. sativa</i>)		2,3	3,1	2,5	4,3	5,1	2,6	2,4	2,7	2,0	4,7	6,1
LoliumRes_a17 958_150	Thaumatococcus-like pathogenesis-related protein 4 (<i>A. sativa</i>)	3,0	3,7	3,9	2,1	4,8	5,6		2,1	3,7		4,8	5,3
LoliumSus_a50 225_89	Thaumatococcus-like pathogenesis-related protein 4 (<i>A. sativa</i>)	3,1	3,5	4,0	2,9	5,6	6,4		2,0	3,6		5,7	6,0
comp174803_c 1_seq2	Thaumatococcus-like pathogenesis-related protein (<i>A. sativa</i>)			4,4				3,0	3,6	3,5			exklu siv
comp228522_c 0_seq1	Thaumatococcus-like protein 1 (<i>Castanea sativa</i>)			exklu siv			exklu siv			exklu siv			exklu siv
comp131978_c 2_seq1	Wheatwin-2 (<i>T. aestivum</i>)			4,9		3,0	5,2			3,3		4,4	7,4
comp175497_c 0_seq1	Wheatwin-2 (<i>T. aestivum</i>)		2,2	3,0	exklu siv	exklu siv	exklu siv	3,7	3,3	4,3		4,8	5,8
LoliumRes_a23 00_676	Wheatwin-2 (<i>T. aestivum</i>)			5,0		3,7	5,7			3,3		2,7	5,7

LoliumRes_a2671_773	Wound-induced protein WIN2 (<i>S. tuberosum</i>)	2,9	3,8		2,6	5,0	5,1	3,4	2,9	3,9	3,2	6,5	6,9
comp154752_c0_seq5	Zeamatin (<i>Z. mays</i>)		exklusiv					4,5	3,6	6,8			
LoliumRes_a520_1880	Zeamatin (<i>Z. mays</i>)		4,0				4,2			2,2			4,6
LoliumRes_a68140_45	Zeamatin (<i>Z. mays</i>)		exklusiv					3,5	3,1	5,6			
Transkription und Signalübertragung													
LoliumRes_a11809_59	5'-3' exoribonuclease 4 (<i>A. thaliana</i>)												2,1
LoliumRes_a186_1624	Calreticulin-3 (<i>A. thaliana</i>)											2,3	
comp160750_c0_seq5	CBL-interacting protein kinase 16 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)				exklusiv								
LoliumRes_a6239_190	Chitin elicitor-binding protein (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)					2,2							
LoliumRes_a281764_8	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 19 (<i>A. thaliana</i>)			2,4									
LoliumSus_a327570_10	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 19 (<i>A. thaliana</i>)									2,3			
LoliumRes_a53983_31	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 5 (<i>A. thaliana</i>)	3,0				2,3					2,8	2,9	
LoliumRes_a219355_11	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 7 (<i>A. thaliana</i>)			2,2									
LoliumRes_a303232_6	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 7 (<i>A. thaliana</i>)			2,1									
LoliumRes_a334688_5	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 7 (<i>A. thaliana</i>)	3,2			5,1	4,6	3,6	3,5	2,4	2,3	exklusiv	exklusiv	exklusiv
LoliumRes_a74481_38	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 7 (<i>A. thaliana</i>)	3,4	3,1	2,9	4,0	4,7	3,2	2,3	2,1		4,0	4,8	3,5
LoliumRes_a94930_31	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 7 (<i>A. thaliana</i>)	4,7	3,8	3,1	3,1						2,5		
LoliumSus_a58581_43	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 7 (<i>A. thaliana</i>)	3,6	3,6	3,1	3,8	4,7	2,9				6,0	6,7	5,5
LoliumRes_a71702_29	E3 ubiquitin-protein ligase ATL6 (<i>A. thaliana</i>)	6,4	5,1	4,9	3,6	4,5	3,3	3,1	2,2	2,8	4,8	6,2	5,0
LoliumRes_a96773_21	E3 ubiquitin-protein ligase ATL6 (<i>A. thaliana</i>)				4,0	2,1					2,3		
LoliumSus_a73822_30	E3 ubiquitin-protein ligase ATL6 (<i>A. thaliana</i>)	3,8	2,9	3,3	4,8	6,3	5,0	3,0	2,2	2,6	4,4	6,1	4,7
comp150518_c0_seq1	E3 ubiquitin-protein ligase PUB22 (<i>A. thaliana</i>)					exklusiv							

comp150518_c0_seq2	E3 ubiquitin-protein ligase PUB22 (<i>A. thaliana</i>)			exklusiv				
LoliumRes_a1104983_3	E3 ubiquitin-protein ligase PUB22 (<i>A. thaliana</i>)				exklusiv			
LoliumRes_a184262_10	E3 ubiquitin-protein ligase PUB23 (<i>A. thaliana</i>)			3,5	6,4	4,5	exklusiv	exklusiv
LoliumRes_a299846_5	E3 ubiquitin-protein ligase PUB23 (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv	exklusiv					
LoliumRes_a54244_34	E3 ubiquitin-protein ligase SPL11 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)						2,2	2,0
LoliumSus_a44064_34	E3 ubiquitin-protein ligase SPL11 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)						2,8	2,9
LoliumRes_a31000_64	E3 ubiquitin-protein ligase XB3 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)		2,5					
LoliumSus_a5994_220	Ethylene-responsive transcription factor 1 (<i>S. lycopersicum</i>)				2,3		2,1	
LoliumRes_a7291_173	Ethylene-responsive transcription factor 1A (<i>A. thaliana</i>)				2,1		3,2	3,0
LoliumRes_a141091_16	Ethylene-responsive transcription factor 1B (<i>A. thaliana</i>)				3,7	3,4		2,9
LoliumSus_a128071_21	Ethylene-responsive transcription factor 1B (<i>A. thaliana</i>)				3,8	3,4	exklusiv	
LoliumRes_a11629_147	Ethylene-responsive transcription factor 3 (<i>A. thaliana</i>)				2,7			
LoliumSus_a10047_126	Ethylene-responsive transcription factor 4 (<i>Nicotiana sylvestris</i>)				2,8			
LoliumRes_a36771_51	Ethylene-responsive transcription factor 5 (<i>A. thaliana</i>)				3,9	2,9		
LoliumSus_a37194_63	Ethylene-responsive transcription factor 5 (<i>A. thaliana</i>)				3,7	2,6		
LoliumRes_a290854_6	Ethylene-responsive transcription factor ERF094 (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv						
LoliumRes_a77199_31	Ethylene-responsive transcription factor ERF094 (<i>A. thaliana</i>)	3,0		exklusiv	exklusiv		4,1	
LoliumSus_a105426_17	Ethylene-responsive transcription factor ERF094 (<i>A. thaliana</i>)	2,7		3,8	2,4	2,9	exklusiv	exklusiv
LoliumSus_a544067_3	Ethylene-responsive transcription factor ERF094 (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv						
LoliumSus_a9468_72	F-box/LRR-repeat MAX2 homolog (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)				2,3			
comp101129_c0_seq1	FHA domain-containing protein DDL (<i>A. thaliana</i>)	4,5		3,5		4,9		exklusiv

LoliumRes_a34 118_55 comp140254_c 0_seq2	GDP-L-galactose phosphorylase 1 (<i>A. thaliana</i>)	3,6			3,4	2,2		4,0		3,0	3,7
LoliumRes_a54 9070_4	GDP-L-galactose phosphorylase 2 (<i>A. thaliana</i>)							2,0			2,3
LoliumRes_a83 663_16	Glutamate receptor 2.7 (<i>A. thaliana</i>)				3,6					4,1	4,9 4,4
LoliumSus_a11 1189_23	Glutamate receptor 2.7 (<i>A. thaliana</i>)	4,3			exkl siv						2,5 2,0
LoliumRes_a18 8651_12	Glutamate receptor 2.7 (<i>A. thaliana</i>)	3,1	3,4	2,1	exkl siv	exkl siv	exkl siv	2,3	2,5	5,0	6,0 5,0
LoliumRes_a40 029_18	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase B120 (<i>A. thaliana</i>)	2,4		2,1							
LoliumRes_a47 799_16	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase B120 (<i>A. thaliana</i>)	2,6		2,4							2,2
LoliumSus_a31 3510_6	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase B120 (<i>A. thaliana</i>)	2,2			2,7	3,4	2,2	2,0		3,6	5,1 4,0
Contig3760	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase SD1-13 (<i>A. thaliana</i>)			exkl siv							
LoliumRes_a38 50_193	Jasmonate O-methyltransferase (<i>A. thaliana</i>)			3,3							
LoliumSus_a79 48_118	Jasmonate O-methyltransferase (<i>A. thaliana</i>)	4,6	3,8	4,2	5,0	6,8	4,4	3,4	3,3	3,6	3,8 6,3 3,6
LoliumRes_a55 1946_6	Jasmonate O-methyltransferase (<i>A. thaliana</i>)	4,7	4,2	4,2	4,8	6,3	3,8	3,3	3,2	3,4	4,1 6,8 4,0
LoliumSus_a35 410_37	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase PEPR1 (<i>A. thaliana</i>)				2,4	3,3		3,2	3,7		
comp135117_c 0_seq2	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase PEPR2 (<i>A. thaliana</i>)										4,2
LoliumRes_a28 81_334	Leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine/tyrosine-protein kinase SOBIR1 (<i>A. thaliana</i>)				3,6	3,9	2,6	2,6	2,2		3,4 2,7
LoliumSus_a49 89_176	Leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine/tyrosine-protein kinase SOBIR1 (<i>A. thaliana</i>)				2,6	3,5	2,2			2,1	2,4 2,2
LoliumRes_a33 6644_5	Leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine/tyrosine-protein kinase SOBIR1 (<i>A. thaliana</i>)				2,6	3,0	2,2			2,5	3,5 3,0
LoliumSus_a54 507_42	Leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine/tyrosine-protein kinase SOBIR1 (<i>A. thaliana</i>)				2,5	2,8	2,1			2,5	3,4 3,1
LoliumSus_a62 816_32	LOB domain-containing protein 41 (<i>A. thaliana</i>)	exkl siv						4,6			
	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase EFR (<i>A. thaliana</i>)	2,1									
	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase EFR (<i>A. thaliana</i>)										3,5

LoliumRes_a12 5468_15	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2 (A. <i>thaliana</i>)	2,4				3,4					2,2			
LoliumRes_a29 9027_5	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2 (A. <i>thaliana</i>)					exklu siv								
LoliumRes_a60 5768_5	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2 (A. <i>thaliana</i>)					3,7					4,1			
LoliumSus_a19 5838_8	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2 (A. <i>thaliana</i>)					exklu siv					3,2	2,7	2,2	
LoliumSus_a31 998_41	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2 (A. <i>thaliana</i>)	2,5				2,7					2,3	2,8		
LoliumRes_a10 1869_16	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (A. <i>thaliana</i>)												2,7	
LoliumRes_a11 033_102	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (A. <i>thaliana</i>)	3,3	3,1	2,0		4,9	4,7	3,6	2,1	2,1	4,2	5,7	4,4	
LoliumRes_a13 0178_14	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (A. <i>thaliana</i>)	2,7				exklu siv	exklu siv	exklu siv	3,7		exklu siv	exklu siv	exklu siv	
LoliumRes_a14 2053_19	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (A. <i>thaliana</i>)	3,8	3,5	3,5		4,2	6,1	4,6	2,8	2,6	3,1	3,7	5,4	3,7
LoliumRes_a37 517_32	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (A. <i>thaliana</i>)	2,5	2,6	2,1			2,5				2,6	3,9	3,7	
LoliumRes_a42 8413_7	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (A. <i>thaliana</i>)												3,4	
LoliumRes_a43 247_39	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (A. <i>thaliana</i>)	3,6	2,7	3,5		3,1	4,5	3,5	2,3	2,0	2,5	4,3	5,6	4,9
LoliumRes_a53 588_25	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (A. <i>thaliana</i>)								2,9	2,4				
LoliumRes_a57 022_27	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (A. <i>thaliana</i>)	4,0	3,1	2,6		6,5	4,9	3,9	2,3			6,7	7,0	5,8
LoliumRes_a69 516_38	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (A. <i>thaliana</i>)						3,0	2,8				5,1	4,9	
LoliumRes_a71 954_33	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (A. <i>thaliana</i>)		2,4	3,2		2,5	4,0	4,8				4,5	5,7	
LoliumRes_a81 363_43	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (A. <i>thaliana</i>)	2,4		2,8			3,9	3,6					2,7	
LoliumRes_a89 806_29	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (A. <i>thaliana</i>)	4,1	4,3	4,4			3,0	2,9				3,9	3,5	
LoliumRes_a91 13_100	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (A. <i>thaliana</i>)	2,2	3,2			6,1	6,7	4,9			3,9	5,6	4,0	
LoliumRes_a96 153_27	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (A. <i>thaliana</i>)		2,3			2,2	3,0					2,5		
LoliumSus_a10 231_87	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (A. <i>thaliana</i>)	2,0	2,9			3,6	4,7	3,0			3,6	5,3	4,0	

LoliumSus_a15 9227_14	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (A. <i>thaliana</i>)	5,1	4,2		3,9	5,5	3,8	3,3		2,9	3,7	2,9
LoliumSus_a17 3192_11	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (A. <i>thaliana</i>)											3,9
LoliumSus_a18 03446_2	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (A. <i>thaliana</i>)							2,7				
LoliumSus_a24 4520_11	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (A. <i>thaliana</i>)		2,5									2,6
LoliumSus_a61 533_25	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (A. <i>thaliana</i>)	3,9	2,9	2,2	5,6	4,5	3,4	2,0		5,6	6,1	4,5
LoliumSus_a70 559_35	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (A. <i>thaliana</i>)	2,9		3,1	3,7	5,5	5,3					2,6
LoliumSus_a93 453_26	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 (A. <i>thaliana</i>)			2,1		3,9	3,2				4,2	4,2
comp161008_c 0_seq4	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.2 (A. <i>thaliana</i>)	5,2	6,0		4,0	5,6		5,4			exklu siv	
comp161008_c 0_seq5	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.2 (A. <i>thaliana</i>)	5,4	6,4		4,4	5,8					4,1	
comp161008_c 0_seq7	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.2 (A. <i>thaliana</i>)	4,0	5,1		3,3	4,5		3,4			4,0	
comp161008_c 0_seq8	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.2 (A. <i>thaliana</i>)	5,5	6,0	3,1	4,8	5,9		4,6	4,9		5,0	
comp161008_c 0_seq9	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.2 (A. <i>thaliana</i>)	5,4	6,3	3,4	3,5	4,9		3,6	3,6		exklu siv	
comp181454_c 0_seq1	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.2 (A. <i>thaliana</i>)					2,5						
LoliumRes_a10 8514_24	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.2 (A. <i>thaliana</i>)	5,7	5,9	6,6	exklu siv	exklu siv	exklu siv exklu siv	3,0	2,4	3,0	exklu siv	exklu siv
LoliumRes_a19 2180_14	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.2 (A. <i>thaliana</i>)							2,3				2,0
LoliumRes_a22 029_46	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.2 (A. <i>thaliana</i>)	3,9	4,1	4,9		4,5	4,2	2,8	2,7	4,0	5,1	6,1
LoliumRes_a25 579_89	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.2 (A. <i>thaliana</i>)	3,3			3,6	3,4	3,5	2,1			2,2	2,3
LoliumRes_a35 0286_4	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.2 (A. <i>thaliana</i>)			3,4				3,0	2,7	2,3		
LoliumRes_a35 766_79	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.2 (A. <i>thaliana</i>)	2,8	2,7		2,8	3,8	2,6				2,1	3,1
LoliumRes_a39 6029_6	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.2 (A. <i>thaliana</i>)	2,2						2,7			3,6	
LoliumRes_a82 4672_3	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.2 (A. <i>thaliana</i>)		exklu siv		2,2							

LoliumSus_a37334_71	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.2 (<i>A. thaliana</i>)	2,3	2,4		2,1				3,3	2,8
LoliumRes_a55220_24	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 15a (<i>A. thaliana</i>)	2,5		2,1	2,4					
LoliumRes_a592273_4	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 15a (<i>A. thaliana</i>)					3,1				
LoliumRes_a14438_127	Mitogen-activated protein kinase 5 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)	2,1		2,2	2,1				2,1	2,2
LoliumSus_a13454_108	Mitogen-activated protein kinase 5 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)				2,1					
Contig5177	Phytosulfokine receptor 1 (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv								
LoliumRes_a257201_7	Phytosulfokine receptor 1 (<i>A. thaliana</i>)		2,1		3,0	3,2			3,9	4,5 2,6
LoliumSus_a191506_13	Phytosulfokine receptor 1 (<i>A. thaliana</i>)		2,2		3,2	3,1			3,7	3,8 2,7
LoliumSus_a207255_10	Phytosulfokine receptor 1 (<i>A. thaliana</i>)			2,2			2,3			
comp104992_c0_seq1	Pre-mRNA-splicing factor SPF27 homolog (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv	exklusiv		exklusiv	exklusiv				
LoliumSus_a355659_8	Probable leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At1g35710 (<i>A. thaliana</i>)			2,1		3,4	3,2			exklusiv
LoliumRes_a45485_40	Probable leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase At5g15730 (<i>A. thaliana</i>)									2,2
LoliumRes_a29134_73	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g74360 (<i>A. thaliana</i>)	2,8	2,6	2,1	2,6					
LoliumSus_a34012_37	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g74360 (<i>A. thaliana</i>)	5,1		3,8		2,1				
LoliumRes_a268348_7	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850 (<i>A. thaliana</i>)							2,7 3,2 2,4		
LoliumRes_a78112_20	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850 (<i>A. thaliana</i>)	3,1			4,8	4,4	3,9		3,2	2,4 2,1
LoliumRes_a82414_15	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850 (<i>A. thaliana</i>)	2,8	2,4		4,9	5,2	4,1	2,1 2,2	5,4	5,8 5,2
LoliumSus_a619913_4	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850 (<i>A. thaliana</i>)	3,7	3,2		5,0	2,7			4,6	4,3
LoliumSus_a15330_97	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c (<i>A. thaliana</i>)					2,6				
LoliumRes_a43550_46	Probable receptor-like protein kinase At5g39020 (<i>A. thaliana</i>)				3,3	3,2	2,5		2,2	3,4 2,8
LoliumRes_a49340_27	Probable receptor-like protein kinase At5g47070 (<i>A. thaliana</i>)				3,1	3,2			2,1	2,2

[illegible]

LoliumRes_a12 841_130	Probable WRKY transcription factor 50 (<i>A. thaliana</i>)				3,1	4,0	3,2		2,3	2,2	3,7	2,6
LoliumSus_a11 542_122	Probable WRKY transcription factor 50 (<i>A. thaliana</i>)				2,5	3,2	2,4				2,6	
LoliumRes_a21 206_41	Probable WRKY transcription factor 51 (<i>A. thaliana</i>)				3,3	3,4	2,3				4,3	5,4 3,8
LoliumRes_a34 607_51	Probable WRKY transcription factor 51 (<i>A. thaliana</i>)	2,5	2,6	2,2	3,8	4,6		2,3	2,1		3,4	5,3 2,6
LoliumSus_a31 384_34	Probable WRKY transcription factor 51 (<i>A. thaliana</i>)				3,5	3,6	3,0				2,9	4,3 2,9
LoliumRes_a20 388_75	Probable WRKY transcription factor 53 (<i>A. thaliana</i>)				2,4							2,2
LoliumRes_a91 3315_3	Probable WRKY transcription factor 53 (<i>A. thaliana</i>)	4,7	4,5		4,7	4,0		2,7			exkl siv	exkl siv exkl siv
LoliumRes_a66 012_41	Probable WRKY transcription factor 54 (<i>A. thaliana</i>)		4,5		2,4	5,4	3,9		2,4	2,8		exkl siv exkl siv
LoliumRes_a18 3494_11	Probable WRKY transcription factor 56 (<i>A. thaliana</i>)	2,2							3,0			
LoliumRes_a56 59_312	Probable WRKY transcription factor 70 (<i>A. thaliana</i>)					3,1	2,6		2,5	2,6		4,0 4,2
LoliumRes_a71 2367_3	Probable WRKY transcription factor 70 (<i>A. thaliana</i>)			3,7		exkl siv	exkl siv			exkl siv		
LoliumRes_a69 493_15	Probably inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At5g48380 (<i>A. thaliana</i>)					2,4						
LoliumRes_a86 354_14	Probably inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At5g48380 (<i>A. thaliana</i>)				2,7						3,2	
LoliumRes_a89 1362_3	Probably inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At5g48380 (<i>A. thaliana</i>)				exkl siv							
LoliumSus_a10 6430_16	Probably inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At5g48380 (<i>A. thaliana</i>)				2,4						3,2	
LoliumSus_a67 786_19	Probably inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At5g48380 (<i>A. thaliana</i>)											2,2 2,1
LoliumSus_a72 8357_3	Probably inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At5g48380 (<i>A. thaliana</i>)				5,5			2,5			4,1	4,2
LoliumRes_a16 1372_8	Putative serine/threonine-protein kinase-like protein CCR3 (<i>A. thaliana</i>)											2,9
LoliumRes_a21 4376_10	Putative serine/threonine-protein kinase-like protein CCR3 (<i>A. thaliana</i>)			exkl siv								
LoliumRes_a66 583_27	Putative serine/threonine-protein kinase-like protein CCR3 (<i>A. thaliana</i>)	2,8			2,8	3,4			2,0		2,4	
LoliumSus_a11 8092_11	Putative serine/threonine-protein kinase-like protein CCR3 (<i>A. thaliana</i>)											2,9

LoliumSus_a24 4863_10	Putative serine/threonine-protein kinase-like protein CCR3 (<i>A. thaliana</i>)		exklusiv																
LoliumSus_a65 319_25	Putative serine/threonine-protein kinase-like protein CCR3 (<i>A. thaliana</i>)	2,3														3,5	3,5	2,5	
LoliumRes_a17 084_132	Receptor-like cytosolic serine/threonine-protein kinase RBK1 (<i>A. thaliana</i>)	2,8	2,7	2,1	3,7	4,4	3,1	2,4	2,2							3,5	4,2	3,0	
LoliumRes_a21 9869_13	Receptor-like protein kinase 5 (<i>A. thaliana</i>)	2,7						2,8	3,0										
LoliumRes_a44 48_152	Receptor-like protein kinase 5 (<i>A. thaliana</i>)																2,5	2,1	
LoliumRes_a63 6329_5	Receptor-like protein kinase 5 (<i>A. thaliana</i>)				2,7														
LoliumRes_a15 6759_13	Receptor-like protein kinase FERONIA (<i>A. thaliana</i>)															2,0			
LoliumRes_a24 337_77	Receptor-like protein kinase FERONIA (<i>A. thaliana</i>)																2,4	2,8	
LoliumRes_a54 269_45	Receptor-like protein kinase FERONIA (<i>A. thaliana</i>)				2,8	4,1	2,2										5,7	4,1	
LoliumSus_a35 388_74	Receptor-like protein kinase FERONIA (<i>A. thaliana</i>)					3,1										3,7	5,8	4,4	
LoliumRes_a16 084_62	RPM1-interacting protein 4 (<i>A. thaliana</i>)			2,2								2,1					2,2		
LoliumRes_a17 307_106	Somatic embryogenesis receptor kinase 1 (<i>A. thaliana</i>)	4,0	4,1	3,1	4,1	5,3	4,5	3,0	2,8	3,2						4,0	6,8	6,1	
LoliumRes_a20 5894_7	Systemin receptor SR160 (<i>S. peruvianum</i>)						exklusiv												
LoliumRes_a84 593_31	Systemin receptor SR160 (<i>S. peruvianum</i>)	2,7	2,4		4,6	5,5	3,5	2,1	2,6							3,2	4,2	2,7	
LoliumRes_a18 9279_10	Transcription factor JUNGBRUNNEN 1 (<i>A. thaliana</i>)	2,5			3,8	3,5	2,2										exklusiv		
LoliumRes_a61 4485_4	Transcription factor JUNGBRUNNEN 1 (<i>A. thaliana</i>)	4,1		6,8		exklusiv	exklusiv	3,4	2,9	5,9									
LoliumRes_a10 6320_12	Tyrosine-sulfated glycopeptide receptor 1 (<i>A. thaliana</i>)				2,1													3,0	
LoliumRes_a60 731_16	Tyrosine-sulfated glycopeptide receptor 1 (<i>A. thaliana</i>)				2,1	2,0													
LoliumSus_a17 2892_13	Tyrosine-sulfated glycopeptide receptor 1 (<i>A. thaliana</i>)		4,5			2,0													
LoliumSus_a26 8198_11	Tyrosine-sulfated glycopeptide receptor 1 (<i>A. thaliana</i>)	exklusiv		exklusiv	3,4	4,9				2,2							2,8		
LoliumSus_a82 996_15	Tyrosine-sulfated glycopeptide receptor 1 (<i>A. thaliana</i>)						2,3												2,2

LoliumSus_a30 821_64	Vacuolar-sorting receptor 6 (<i>A. thaliana</i>)				2,0	2,4					2,0		
LoliumRes_a68 4889_4	Wall-associated receptor kinase 1 (<i>A. thaliana</i>)			4,3		exklusiv							
LoliumRes_a35 680_26	Wall-associated receptor kinase 1 (<i>A. thaliana</i>)	2,5			2,7	3,1		2,1		2,7	3,6	2,3	
LoliumRes_a11 2064_30	Wall-associated receptor kinase-like 2 (<i>A. thaliana</i>)							3,3					
LoliumRes_a34 0884_7	Wall-associated receptor kinase-like 2 (<i>A. thaliana</i>)			2,7		2,9	3,1					exklusiv	
LoliumRes_a12 7239_24	WRKY transcription factor 18 (<i>A. thaliana</i>)	3,8				6,0	4,1	3,3	4,1	4,1	exklusiv	exklusiv	
LoliumRes_a51 635_53	WRKY transcription factor 18 (<i>A. thaliana</i>)				4,2					2,4	2,5		
LoliumRes_a11 905_150	WRKY transcription factor 6 (<i>A. thaliana</i>)				2,1	3,1	2,3				2,7	2,3	
Transport													
LoliumRes_a88 54_115	ABC transporter C family member 4 (<i>A. thaliana</i>)										2,1		
LoliumRes_a41 66_294	Amino acid permease 3 (<i>A. thaliana</i>)					2,9	2,3						
LoliumRes_a29 691_58	Aminotransferase ALD1 homolog (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)			6,0				6,3	6,2	6,4		exklusiv	
LoliumRes_a99 010_17	Anthranilate phosphoribosyltransferase, chloroplastic (<i>A. thaliana</i>)	2,8		3,2		2,5			2,2	3,8	2,1		
LoliumRes_a26 150_95	Calcium-transporting ATPase 2, plasma membrane-type (<i>A. thaliana</i>)					2,7					2,7		
LoliumSus_a20 727_133	Calcium-transporting ATPase 2, plasma membrane-type (<i>A. thaliana</i>)					2,6					2,5		
LoliumRes_a16 777_123	Cationic amino acid transporter 1 (<i>A. thaliana</i>)	2,3		2,3	2,2	2,5	3,7				2,5	2,9	3,8
LoliumRes_a49 651_82	Cationic amino acid transporter 1 (<i>A. thaliana</i>)	3,2	2,8	2,5	2,5	4,0	4,5				exklusiv	exklusiv	exklusiv
LoliumSus_a23 901_100	Cationic amino acid transporter 1 (<i>A. thaliana</i>)			2,3		2,3	3,8	4,6			2,6	3,5	4,6
LoliumSus_a34 897_112	Cationic amino acid transporter 1 (<i>A. thaliana</i>)			2,0	2,6	2,8	3,5				3,0	3,8	4,5
LoliumRes_a17 5233_12	Organic cation/carnitine transporter 7 (<i>A. thaliana</i>)					2,3					2,9		
LoliumRes_a15 933_88	Peptide transporter PTR3-A (<i>A. thaliana</i>)										2,1	2,4	
LoliumRes_a24 17_469	Peptide transporter PTR3-A (<i>A. thaliana</i>)										2,1	2,2	2,3

[illegible]

LoliumRes_a357569_5	12-oxophytodienoate reductase 1 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)	2,1										2,5		
LoliumRes_a256381_15	3-ketoacyl-CoA synthase 6 (<i>A. thaliana</i>)		2,2											
comp173644_c2_seq17	4-coumarate--CoA ligase-like 10 (<i>A. thaliana</i>)									exklusiv				
comp173644_c2_seq9	4-coumarate--CoA ligase-like 10 (<i>A. thaliana</i>)											exklusiv		
LoliumRes_a7407_171	4-coumarate--CoA ligase-like 10 (<i>A. thaliana</i>)	3,5	3,9	2,7	3,8	5,2	3,1	3,2	3,4	2,9	3,2	5,4	3,1	
LoliumSus_a800620_3	Acyl-[acyl-carrier-protein] desaturase 1, chloroplastic (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)	7,3												
LoliumRes_a381384_7	Long chain acyl-CoA synthetase 4 (<i>A. thaliana</i>)		3,4	4,4	exklusiv	exklusiv	exklusiv			2,5		exklusiv	exklusiv	
LoliumSus_a436024_6	Long chain acyl-CoA synthetase 4 (<i>A. thaliana</i>)		3,4	3,7		exklusiv	exklusiv	3,4	4,2	4,1		exklusiv	exklusiv	
LoliumSus_a50417_30	Long chain acyl-CoA synthetase 4 (<i>A. thaliana</i>)	2,3			2,5	2,1						2,5		
LoliumRes_a48886_27	Long chain acyl-CoA synthetase 5 (<i>A. thaliana</i>)	2,5	2,4		2,2							2,4		

LoliumRes_a13 5003_10	Indole-3-glycerol phosphate synthase, chloroplastic (<i>A. thaliana</i>)	2,6	4,5	2,8	3,4	2,6	5,8
LoliumRes_a18 946_56	Indole-3-glycerol phosphate synthase, chloroplastic (<i>A. thaliana</i>)			2,2			
LoliumRes_a30 229_56	Indole-3-glycerol phosphate synthase, chloroplastic (<i>A. thaliana</i>)			2,3			

LoliumRes_a74 4854_4	U-box domain-containing protein 20 (<i>A. thaliana</i>)			3,6	3,6	4,1	3,0	5,6	4,9	4,8		exkl siv	exkl siv
LoliumSus_a45 4680_6	U-box domain-containing protein 20 (<i>A. thaliana</i>)	3,8	4,0	3,1	5,6	6,7	5,3	3,7	3,0	3,1	exkl siv	exkl siv	exkl siv
LoliumRes_a14 3640_16	U-box domain-containing protein 21 (<i>A. thaliana</i>)	3,2	2,2		3,4	4,2	2,0	3,3	3,2		4,6	4,8	2,8
LoliumRes_a33 125_46	U-box domain-containing protein 21 (<i>A. thaliana</i>)	3,7	3,1	2,5	4,6	5,0	3,8	2,8	2,5		4,3	5,5	4,4
LoliumSus_a91 958_20	U-box domain-containing protein 21 (<i>A. thaliana</i>)	2,5	2,2		6,5	5,4	3,6	2,4	2,2		3,9	4,1	2,4
LoliumSus_a47 1752_4	U-box domain-containing protein 51 (<i>A. thaliana</i>)					2,8						exkl siv	
comp58198_c0 _seq1	U-box domain-containing protein 72 (<i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>)	exkl siv	exkl siv	exkl siv	exkl siv	exkl siv	exkl siv			exkl siv			exkl siv
Sonstige													
LoliumRes_a90 9785_4	AST_5595 mRNA sequence (<i>Agrostis stolonifera</i>)			3,1						2,3			
comp151450_c 0_seq1	Aldehyde dehydrogenase family 2 member C4 (<i>A. thaliana</i>)			3,1									
LoliumRes_a11 842_62	Aldehyde dehydrogenase family 2 member C4 (<i>A. thaliana</i>)			2,2					2,2	2,6			
LoliumRes_a29 192_56	Aldehyde dehydrogenase family 2 member C4 (<i>A. thaliana</i>)			2,7									3,7
LoliumRes_a49 070_27	Uncharacterized protein At5g05190 (<i>A. thaliana</i>)					2,2							
LoliumSus_a19 9620_10	Uncharacterized protein BRADI3G19967 (<i>B. distachyon</i>)						3,2						
LoliumRes_a79 851_21	Uncharacterized protein BRADI4G01117 (<i>B. distachyon</i>)											2,8	
LoliumRes_a67 386_44	Uncharacterized protein BRADI4G07902 (<i>B. distachyon</i>)	2,0			2,7	3,8	2,9				2,4	2,5	2,1
LoliumSus_a53 648_59	Uncharacterized protein BRADI4G07902 (<i>B. distachyon</i>)				3,0	3,5	3,0					3,0	2,3
LoliumRes_a33 466_73	Uncharacterized protein BRADI4G07910 (<i>B. distachyon</i>)					2,6							
LoliumRes_a76 04_261	Uncharacterized protein BRADI4G10180 (<i>B. distachyon</i>)											2,0	3,4
LoliumSus_a91 96_264	Uncharacterized protein BRADI4G10180 (<i>B. distachyon</i>)						2,2					2,2	3,4
LoliumSus_a23 4496_12	Uncharacterized protein BRADI4G12877 (<i>B. distachyon</i>)					2,1							
LoliumSus_a37 9817_8	Uncharacterized protein BRADI4G35317 (<i>B. distachyon</i>)			exkl siv		exkl siv	exkl siv	3,6		4,1		3,7	3,0

LoliumRes_a42 8387_7	Uncharacterized protein BRADI4G35317 (<i>B. distachyon</i>)	3,1	3,8	exklusiv	exklusiv	3,2	3,3	exklusiv	exklusiv
LoliumRes_a26 0681_12	Uncharacterized protein (<i>B. distachyon</i>)					2,7			

Thesen

Das ausdauernde Weidelgras (*Lolium perenne* L.) ist eines der bedeutendsten Futtergräser in den gemäßigten Breiten weltweit und nimmt den größten Anteil der Grassamennutzung in Europa ein. Durch die weltweite Verbreitung als Rasen- und Futtergras stellen phytopathogene Pilze eine signifikante Bedrohung für den Anbau dar. Dazu zählen der Schwarzrost (*Puccinia graminis* f.sp. *graminicola*) in der Grassamenproduktion und der Kronenrost (*Puccinia coronata* f.sp. *lolii*) in der Produktion von Gras als Wiederkäuerfutter.

Zum Gefahrenpotential des Schwarzrostes gehören Ertragsverluste, die bis zum Totalausfall führen können, sowie Qualitätsminderungen, die in reduzierten Keimfähigkeiten und Tausendkorngewichte der Grassamen resultieren. Der Kronenrost kann zu erheblichen Trockenmasse- und Qualitätsverlusten auf Wiesen und Weiden, sowie zu einem erhöhten Absterben von Bestockungstrieben führen. Die Züchtung von resistenten Sorten stellt bei der Bekämpfung dieser Pathogene die wirtschaftlich und ökologisch am meisten effiziente Lösung dar. Eine Beschleunigung der Rostresistenzzüchtung kann durch die Bereitstellung von molekularen Resistenzmarkern erfolgen, indem zeitaufwändige Resistenztests ersetzt und die Anzucht und Pflege auf resistente Kreuzungsnachkommen konzentriert wird. Die Identifikation von Resistenzmarkern in *L. perenne* beschränkte sich bisher auf DNA-basierte Markersysteme und QTL-Analysen („quantitative trait loci“). Wesentlich effizienter sind Transkriptom-basierte Methoden die ausschließlich exprimierte Sequenzen erfassen und sich wiederholende Regionen aussparen. Zusätzlich zur Markerentwicklung können, die mit diesen Methoden gewonnenen Informationen dazu beitragen, molekulare Mechanismen der Resistenzen aufzudecken bzw. diese an Hand ihrer Genexpressionsprofile zu charakterisieren. Ein weiterer Vorteil der Transkriptom-basierten Methoden ist die Möglichkeit, über eine „*in silico*“-Kartierung der resistenzassoziierten Gene auf die Lage des Resistenzlokus zu schließen.

Ziel dieser Arbeit ist, erstmalig die Entwicklung Transkriptom-basierter molekularer Schwarzrostresistenzmarker im hochgradig heterozygoten Gras, *L. perenne*, von der Phänotypisierung bis zum nutzbaren molekularen Marker zu beschreiben. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob über eine „*in silico*“-

Kartierung der resistenzassoziierten Transkripte und SNPs zusammen mit dem „perennial ryegrass GenomeZipper“ eine Lokalisation des Schwarzrostresistenzlokus *LpPg1* auf einer spezifischen Kopplungsgruppe von *L. perenne* möglich ist. Über die Genexpressionsprofile sollte versucht werden, auf den Schwarzrost-Resistenzmechanismus von *LpPg1* zu schließen.

Neben *LpPg1* wurden zwei Kronenrostresistenzen in derselben Kartierungspopulation identifiziert. Beide Kronenrostresistenzen sollen in dieser Arbeit fluoreszenzmikroskopisch und durch Transkriptom-weite Genexpressionsanalysen charakterisiert werden. Dabei sollte die Rostentwicklung in ausgewählten Kronenrost resistenten Genotypen erfasst werden und durch den Vergleich von Rostentwicklungskurven auf den Zeitpunkt sowie durch mikroskopische Dokumentation auf die Resistenzreaktionen geschlossen werden. Aus einem Zeitreihenversuch sollte inokuliertes und nicht inokuliertes Blattmaterial entnommen werden und mittels Transkriptom-weiten Genexpressionsanalysen die resistenzspezifische Transkription der Kronenrostresistenzen erfasst werden.

Aus den Ergebnissen und den gezogenen Schlussfolgerungen der vorangestellten Untersuchungen werden folgende Thesen abgeleitet:

- Mit der Kombination aus „Bulked Segregant Analysis“ und der Transkriptom-basierten Genexpressionsanalyse „massive analysis of cDNA ends“ ist es möglich, Schwarzrostresistenz-assoziierte Transkripte und SNPs zu identifizieren.
- Von den Sequenzen Schwarzrostresistenz-assoziiierter Transkripte und SNPs lassen sich molekulare Marker ableiten, die polymorph für das beschriebene Merkmal und mit dem Resistenzlokus gekoppelt sind sowie eine Feinkartierung des Resistenzlokus zulassen. DNA-basierte Markersysteme können somit durch Transkriptom-basierte Genexpressionsanalysen ersetzt werden.
- Die Position des Schwarzrostresistenzlokus *LpPg1* kann durch eine „*in silico*“-Kartierung von Resistenz-assoziierten Transkripten, SNPs und molekularen Markern eingegrenzt werden.

- Genexpressionsprofile von inokulierten und nicht inokulierten Schwarzrost anfälligen und resistenten Genotypen lassen auf den Abwehrmechanismus der vorhandenen Resistenz schließen.
- Eine Kronenrostresistenz-Phänotypisierung mit Feldisolaten verschiedener Standorte zeigte Unterschiede in der Resistenzausprägung der Genotypen. Es wurden vollständig resistente, moderat resistente und anfällige Genotypen ermittelt.
- Unterschiedliche Anzahlen von Kronenrost resistenten und anfälligen Genotypen zwischen den Feldisolaten sind auf standortspezifische Pathotypen zurückzuführen. Um neue Resistenzen zu entdecken ist es notwendig das Pflanzenmaterial mit möglichst verschiedenen Kronenrostfeldisolaten zu testen.
- Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der entwickelten Roststrukturen in Kronenrost resistenten und anfälligen Genotypen ließ auf den Zeitpunkt der Pathogenerkennung und die zugrundeliegenden Resistenzreaktionen schließen. Dabei wurden eine quantitative und eine qualitative Kronenrostresistenz durch Vergleiche der Rostentwicklungskurven identifiziert.
- Die Entwicklungsgeschwindigkeit von der quantitativen „slow rusting“-Resistenz ist gegenüber anfälligen Genotypen reduziert.
- Durch Autofluoreszenz der Mesophyllzellen, nach Kontakt mit Haustorienmutterzellen des Kronenrostes im vollständig resistenten Genotyps, konnte ein hypersensitiver Zelltod in diesen Zellen festgestellt werden.
- Mit der Transkriptom-basierten NGS-Methode MACE wurden Kronenrostresistenz-assoziierte Genexpressionsprofile spezifisch für jede Kronenrostresistenz identifiziert. Die Überexpression von Transkripten mit Zuordnung zum hypersensitiven Zelltod bestätigt die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen. Die „slow rusting“-Resistenz zeigte eine Überexpression von „pathogenesis-related protein“- und antifungalen Protein-Genen.
- Die Schwarz- und Kronenrostresistenz-Phänotypisierungen zeigten keine Korrelation zwischen den Rostresistenzen. Eine hohe Korrelation

innerhalb der Schwarz- und Kronenrostisolate ist auf geringe Virulenzunterschiede der Feldisolate zurückzuführen.

- In Vergleichen zwischen den Genexpressionsprofilen der Schwarz- und Kronenrost resistenten Bulks bzw. Genotypen wurden geringe Übereinstimmungen in der Genexpression festgestellt.
- Die Schwarz- und Kronenrostresistenzen sind aufgrund der Unterschiede in den Rostresistenz-Phänotypisierungen und in den Genexpressionsprofilen als eigenständige und unabhängig voneinander vererbte Resistenzen zu betrachten.

Danksagung

Frau Dr. Struck danke ich für die Überlassung des Themas, der hilfsbereiten Betreuung, Unterstützung während aller Phasen der Dissertation und der kritischen Durchsicht der Arbeit.

Ich bedanke mich bei meinen Kollegen und Kolleginnen von der Universität Rostock und dem Julius-Kühn Institut in Groß Lüsewitz für die herzliche Arbeitsatmosphäre und die konstruktiven Gespräche.

Mein herzlicher Dank gilt Martina Goltermann, Rosa Minderlen, Katrin Schönherr, Mariane Müller und Ingolf Gliege für die Unterstützung im Gewächshaus und Labor.

Sabine Schulze, Ottilia Nhengiwa, Christof Böhm, Dr. Bernhard Saal, Dr. Peter Winter, Dr. Björn Rotter und Nicolas Krezdorn danke ich für die gute Zusammenarbeit im ReTroLo- und LoMaRe-Projekt, sowie für die konstruktiven Diskussionen.

Ich danke Dr. Brigitte Ruge-Wehling für ihren Einsatz im LoMaRe-Projekt und Kristin Fischer für ihr stets offenes Ohr bei Fragen zur Markerentwicklung.

Zum Schluss gilt mein Dank meiner Großmutter Ingeborg Awolin und meinen Eltern, für ihre Unterstützung und ihren Zuspruch in jeder Lebenslage.

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Waren, 31. Januar 2017

Jens Bojahr